



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DAS MICOPLASMOSES
HEMÁTICAS FELINAS EM PORTUGAL

VÂNIA RAQUEL FARIA MARQUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor Virgílio da Silva Almeida

VOGAIS

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier

Féliz Lourenço Martins

ORIENTADOR

Doutor José Henrique Duarte Correia

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

2013

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DAS MICOPLASMOSES
HEMÁTICAS FELINAS EM PORTUGAL

VÂNIA RAQUEL FARIA MARQUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor Virgílio da Silva Almeida

VOGAIS

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier

Féliz Lourenço Martins

ORIENTADOR

Doutor José Henrique Duarte Correia

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

2013

LISBOA

À minha mãe,

Por tudo.

Ao meu primeiro cão, Piruçã

Pelos 15 anos de companheirismo e amizade verdadeira.

Pelo sorriso único e fiel com que sempre nos recebia.

Por me dares tanta vontade de concretizar este sonho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Henrique Duarte Correia, por ter aceitado o meu pedido e me ter orientado nesta jornada difícil de escrita desenfreada. Por toda a calma e motivação que sempre me transmitiu.

De seguida gostaria de agradecer à Professora Ana Duarte por todo o seu apoio, carinho e amizade ao longo de todo este trabalho. Um muito obrigado por ter aceite este tema com tanto entusiasmo e por ter feito de tudo para que ele fosse para a frente.

Ao CIISA pelo apoio financeiro que possibilitou a realização de todo este trabalho e a todo o pessoal dos laboratórios da Faculdade, especialmente à Cátia e ao João que me receberam tão bem e que me ajudaram muito nos breves meses de iniciação à investigação. Um muito obrigado pela amizade e carinho que sempre me dirigiram.

A toda a equipa do Hospital Escolar de Medicina Veterinária de Lisboa, por todo o carinho com que me receberam, por todos os ensinamentos que me transmitiram e por todos os momentos que partilhámos ao longo dos meses de estágio. Quero agradecer especialmente à Doutora Marisa Ferreira, por todo o conhecimento e profissionalismo que dedica a tudo e que tanto me fascina, mas acima de tudo por todo o carinho e amizade com que me recebeu e que espero manter.

A todos os meus amigos de curso, que de certeza ficarão para sempre! À Ana Sofia, à Andreia, à Carla, à Daniela, à Margarida e ao Vasco, um muito obrigada por tudo! Por todos os momentos de festa e diversão que vivemos, por todos os trabalhos que fizemos juntas, por todas as idiotices que tínhamos tão nossas e que tantas saudades deixam, por todas as risadas que partilhámos e que não esqueceremos. Por toda a tua amizade padrinho, por todos os teus conselhos sábios e por me obrigares sempre a estudar quando a vontade não era grande!

Aos meus Pais, por tudo! Pela educação e ideais que sempre me transmitiram, por fazerem de mim quem sou hoje e acima de tudo pelo amor e apoio incondicionais. Gosto muito de vocês.

A todos os familiares que tanto adoro, por todo o carinho e apoio que sinto sempre da vossa parte, em especial aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e afilhados por toda a amizade e carinho que partilhamos diariamente e que nos traz tanta força quando mais precisamos.

Aos meus amigos de infância! À Susana, à Rita, à Susana Domingos, ao Mário e ao Adónis por toda a amizade e carinho que felizmente conseguimos perpetuar! Obrigada por continuarem presentes na minha vida.

Ao meu namorado João, um muito obrigado por tudo. Pelo gosto que partilhamos pelos animais, pelo carinho e amor que todos os dias me dedicas e por todo o apoio que deste e que continuas a dar ao longo destes anos.

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DAS MICOPLASMOSES HEMÁTICAS FELINAS EM PORTUGAL

Estudos recentes têm sido conduzidos por todo o mundo numa tentativa de avaliar o impacto e a prevalência das espécies de hemoplasmas felinos em diferentes populações de animais. Até à data são conhecidas quatro espécies capazes de infectar o gato, que diferem entre si no grau de patogenicidade, sobretudo na presença de determinados factores de risco.

O objectivo do presente estudo centra-se na avaliação da prevalência de infecção por hemoplasmas em 236 gatos de Portugal através da utilização de PCR em tempo real, e na análise de significância dos factores de risco da infecção.

A prevalência geral de hemoplasmas detectada na população em estudo foi de 27,1% (64/236), dos quais, 17,8% (42/236) correspondem à presença de *CMhm*, 14,4% (34/236) à presença de *Mhf* e apenas 5,9% (14/236) à infecção provocada por *CMt*. A presença de co-infecção foi detectada em 8,1% (19/236) das amostras, tendo-se verificado maioritariamente a presença simultânea de *Mhf* e *CMhm* assim como, a presença concomitante das três espécies de hemoplasmas, em 5,9% (14/236) dos animais.

A infecção por hemoplasmas foi associada significativamente com o estilo de vida dos animais (Pertencentes a gatis/Vida livre/Com proprietário) ($P=0,007$), com o habitat (Rua/Casa/Gatil/Casa com acesso esporádico à rua) ($P=0,031$) e com a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina ($P=0,011$), não tendo sido detectada associação com a localização geográfica, a idade e a infecção pelo vírus da leucemia felina. Obteve-se ainda significância entre a infecção provocada por *CMt* e o sexo masculino ($P=0,032$), e entre o tipo de infecção (IU/CoI) ($P=0,012$) provocada por esta espécie, que surgiu maioritariamente em co-infecção.

As proporções obtidas estão de acordo com as prevalências documentadas mundialmente, tendo sido, no entanto, inferiores às proporções detectadas nos animais do Norte e Centro de Portugal. O presente estudo vem complementar a avaliação do panorama geral do País, no que diz respeito à presença de infecção por hemoplasmas felinos.

Palavras chave: Hemoplasmas felinos, *Mhf*, *CMhm*, *CMt*, Prevalência, Factores de risco, FIV, FeLV.

ABSTRACT

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF FELINE HEMATIC MYCOPLASMOSIS IN PORTUGAL

Recent studies have been conducted around the world in an attempt to assess the impact and the prevalence of feline haemoplasma species in different animal populations. To date, there are four known species capable of infecting the cat, which differ in the degree of their pathogenicity, especially in the presence of specific risk factors.

The aim of the present study focuses on the evaluation of the prevalence of haemoplasma infections in 236 cats from Portugal using real-time PCR techniques, and the analysis of the significance of the infection risk factors.

The overall prevalence of haemoplasma detected in the study population was 27.1 % (64/ 236), of which 17.8% (42/ 236) correspond to the presence of *CMhm*, 14.4 % (34/ 236) to *Mhf* and only 5.9 % (14/ 236) to the infection caused by *CMt*. The presence of co-infection was detected in 8.1% (19/ 236) of the samples and it was found mostly the simultaneous presence of *Mhf* and *CMhm* as well as the simultaneous presence of the three species of haemoplasmas in 5.9% (14 / 236) of the animals.

Haemoplasma infection was significantly associated with the lifestyle of the animals (living in catteries/free life/house pet) ($P = 0.007$), with habitat (outdoor/indoor/cattery/indoor with outdoor access) ($P = 0.031$) and infection with feline immunodeficiency virus ($P = 0.011$). No association was found regarding geographical location, age and infection with feline leukemia virus. A significant association between the infection caused by *CMt* and the male gender ($P = 0.032$) and between the type of infection (UI/CoI) ($P = 0.012$) caused by this specie (which appeared mainly in co-infection), was also found.

The values obtained are consistent with the documented worldwide prevalence, although lower than the proportions found in the animals of the North and Central areas from Portugal. This study complements the evaluation of the overall picture of the country, regarding the infection by feline haemoplasmas.

Keywords: Feline haemoplasmas, *Mhf*, *CMhm*, *CMT*, Prevalence, Risk Factors, FIV, FeLV.

ÍNDICE

1.	Actividades desenvolvidas	1
1.1	Actividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular	1
1.2	Actividades desenvolvidas no contexto da componente prática da presente dissertação de mestrado	5
1.3	Comunicação científica dos resultados obtidos no presente estudo.....	5
2.	Introdução.....	6
2.1	Etiologia	6
2.2	Morfologia.....	9
2.3	Prevalência	11
2.4	Factores de risco.....	13
2.5	Modos de transmissão	14
2.5.1	Transmissão por vectores artrópodes	14
2.5.2	Transmissão horizontal	15
2.5.3	Transmissão iatrogénica por transfusão de sangue.....	16
2.5.4	Outros modos de transmissão	17
2.6	Patogénese.....	17
2.7	Sinais clínicos.....	26
2.8	Alterações laboratoriais.....	27
2.9	Diagnóstico.....	29
2.9.1	Diagnóstico citológico	29
2.9.2	Diagnóstico molecular	31
2.10	Tratamento	32
2.10.1	Antibióticos.....	33
2.10.2	Corticosteróides	34
2.10.3	Outros fármacos	35
2.10.4	Terapêutica de suporte	35
2.10.5	Monitorização da resposta ao tratamento	36
2.11	Informação publicada em humanos - Implicações na saúde pública	36
3.	Trabalho experimental.....	38
3.1	A sua importância.....	38
3.2	O objectivo	38
4.	Material e métodos	39
4.1	População seleccionada.....	39
4.2	Critérios de inclusão das amostras	40
4.3	Caracterização das amostras de acordo com as variáveis em estudo	40
4.3.1	Caracterização das amostras de acordo com o estilo de vida	40
4.3.2	Caracterização das amostras por localização geográfica	41
4.3.3	Caracterização das amostras relativamente ao género.....	41
4.3.4	Caracterização das amostras relativamente aos intervalos de idades	42
4.3.5	Caracterização das amostras relativamente ao habitat.....	43
4.3.6	Caracterização das amostras relativamente à presença de retrovírus	43
4.4	Colheita e processamento das amostras	44
4.5	Extracção e quantificação dos ácidos nucleicos.....	45
4.6	Deteção de ácidos nucleicos	46
4.6.1	Controlos positivos e negativos utilizados nas reacções de PCR	47
4.6.2	Reacção de PCR.....	47
4.7	Análise estatística.....	48
5.	Resultados.....	49
5.1	Avaliação da prevalência dos hemoplasmas felinos de acordo com as variáveis definidas	50

5.1.1	Relativamente ao estilo de vida	50
5.1.2	Relativamente à localização geográfica.....	51
5.1.3	Relativamente ao género.....	52
5.1.4	Relativamente ao intervalo de idades	53
5.1.5	Relativamente ao habitat.....	55
5.1.6	Relativamente à presença de retrovírus	56
5.2	Avaliação do tipo de infecção (IU/CoI), de acordo com as variáveis definidas	58
5.3	Avaliação do tipo de co-infecção de acordo com as variáveis definidas	60
5.4	Avaliação da significância para os factores de risco considerados no estudo	62
6.	Discussão de resultados	63
7	Limitações do estudo	69
8.	Conclusão	70
9.	Bibliografia.....	72
10.	Anexos	84
10.1	Actividades desenvolvidas – Comunicação científica dos resultados obtidos no presente estudo no Congresso Internacional da Scivac.....	84
10.2	Resultados	86
10.2.1	Tabela utilizada como base de dados para os cálculos do estudo.....	86
10.2.2	Análise da prevalência geral de hemoplasmas.....	88
10.2.3	Compilação de gráficos não utilizados no corpo do texto referentes à prevalência e tipos de co-infecção.	90

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição do número de horas despendido consoante a área frequentada ao longo do estágio.	1
Gráfico 2 - Distribuição dos animais testados consoante os diferentes estilos de vida.	41
Gráfico 3 - Distribuição dos animais testados por género.	42
Gráfico 4 - Distribuição dos animais testados por intervalo de idades.	42
Gráfico 5 - Distribuição dos animais testados por habitat.	43
Gráficos 6 e 7 - Distribuição dos animais testados de acordo com o resultado dos testes para pesquisa de retrovírus.	44
Gráfico 8 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o estilo de vida.	50
Gráfico 9 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas por estilo de vida.	50
Gráfico 10 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas por conjunto amostral.	51
Gráfico 11 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com a localização geográfica.	51
Gráfico 12 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com a localização geográfica.	52
Gráfico 13 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o género.	52
Gráfico 14 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com o género.	53
Gráfico 15 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o intervalo de idades.	54
Gráfico 16 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com o intervalo de idades.	54
Gráfico 17 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o habitat.	55
Gráfico 18 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com o habitat.	56
Gráfico 19 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o resultado do teste para pesquisa de retrovírus.	56
Gráfico 20 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com os resultados do teste para pesquisa de retrovírus.	57
Gráfico 21 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção.	90
Gráfico 22 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção de acordo com o estilo de vida dos animais.	90
Gráfico 23 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção de acordo com a localização geográfica.	90
Gráfico 24 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção de acordo com o género.	91
Gráfico 25 - Observação da percentagem e tipo de co-infecção de acordo com o intervalo de idades.	91
Gráfico 26 - Observação da percentagem e tipo de co-infecção de acordo com o habitat.	91
Gráfico 27 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção de acordo com o resultado do teste para pesquisa de retrovírus.	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sala de consultas do hospital escolar veterinário da FMV - UL. (Original).....	2
Figura 2 – Sala de radiologia do hospital escolar veterinário da FMV – UL. (Original).....	3
Figura 3 – Ala de internamento do hospital escolar veterinário da FMV – UL. (Original).....	3
Figura 4 - Fotografias de diferentes cirurgias assistidas ao longo do estágio curricular. (Originais).....	4
Figura 5 – Fotografias tiradas durante a realização do trabalho prático, no laboratório de virologia e Biologia Molecular da FMV-UL. (Originais)	5
Figura 6 - Árvore filogenética que mostra a relação entre o novo isolado e as restantes espécies de hemoplasmas (Willi et al., 2005).....	7
Figura 7 - Análise filogenética do gene 16S rRNA dos isolados de CMt e dos microorganismos relacionados (Willi et al., 2006b).....	8
Figura 8 – Visualização de <i>Mhf</i> aderente à superfície dos eritrócitos por ME (Willi et al., 2011 – J. Veterinary Microbiology).	10
Figura 9- Visualização de <i>CMhm</i> (1) e <i>CMt</i> (2 e 3) aderentes à superfície dos eritrócitos por ME (Willi et al., 2011 - J. Veterinary Microbiology).....	10
Figura 10 - Visualização de hemoplasmas por MET. 1 - <i>CMt</i> próximo da superfície dos eritrócitos; 2 e 3 - <i>Mhf</i> aderente à superfície dos eritrócitos (Willi et al., 2011 - J. Veterinary Microbiology).....	11
Figura 11 – Distribuição mundial dos hemoplasmas felinos com base na literatura revista (Imagem retirada de: http://www.santiago.pro.br/mapas/mundo/mundo_mudo_carto.JPG)...	11
Figura 12 – Flutuações da carga de <i>Mhf</i> após infecção (Adaptado de Tasker, 2010).	18
Figura 13 - Média representativa dos valores da hemoglobina em três grupos de gatos infectados com cada uma das três espécies de hemoplasmas felinos, verificando-se que apenas os animais infectados por <i>Mhf</i> exibem valores inferiores aos limites de referência (Adaptado de Tasker, 2010).	19
Figura 14 - Média representativa do número de cópias de hemoplasmas ao longo do tempo para três grupos de gatos infectados com as três espécies (Adaptado de Tasker, 2010).....	21
Figura 15 – Visualização de hemoplasmas num esfregaço sanguíneo de um gato infectado. Fotografia cedida pelo laboratório de análises clínicas da FMV - UL.	29
Figura 16 – Ampliação da figura anterior, realçando a dificuldade em distinguir as espécies apenas com base na sua morfologia.	30
Figura 17 – Fotografia de um gato com sinais de anemia. Imagem obtida de:	38
Figura 18 - Esquematização do agrupamento dos conjuntos de amostras consoante o estilo de vida.	40
Figura 19- Localização geográfica das amostras testadas.	41
Figura 20 – Fotografias originais: 1- Um dos animais admitidos no estudo; 2- Amostra de sangue hemolisada após colheita; 3 - Processamento das amostras.....	45
Figura 21 - Reagentes utilizados na extracção do DNA. (Original).....	45
Figura 22 - Curvas (seta) que traduzem a fluorescência emitida durante a amplificação do produto específico. (Original).....	46
Figura 23 – Ciclos térmicos utilizados no PCR em tempo real para as diferentes espécies. ...	47
Figura 24 – Cópia das páginas do livro de resumos onde consta a comunicação realizada.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência dos <i>primers</i> e das sondas utilizadas nas reacções de PCR.....	47
Tabela 2 - Prevalência de animais positivos a hemoplasmas e o respectivo intervalo de confiança de 95%.....	49
Tabela 3 – Prevalência de hemoplasmas de acordo com o tipo de infecção, tendo em conta as variáveis em estudo.	59
Tabela 4 – Prevalência e tipos de co-infecção, tendo em conta as variáveis em estudo.	61
Tabela 5 – Análise da significância entre a presença de infecção e os factores de risco considerados.	63
Tabela 6 - Análise dos factores de risco de acordo com o teste de razão de possibilidades.	63
Tabela 7 – Tabela utilizada como base de dados do estudo.	86
Tabela 8 - Prevalência geral de hemoplasmas de acordo com as variáveis em estudo.	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Mhf – *Mycoplasma haemofelis*

CMhm – “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”

CMt – “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”

CMhp – “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”

FIV – Vírus da imunodeficiência felina

FeLV – Vírus da leucemia felina

PCR – *Polymerase chain reaction*

RT – PCR – *Real time polymerase chain reaction*

ME – Microscopia electrónica

MET – Microscopia electrónica de transmissão

CML – Câmara Municipal de Lisboa

CATUS – Associação protectora do gato

HE – Hospital escolar

BSV – Banco de Sangue Veterinário

FMV-UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

OR – *Odds ratio*

P – *p-value* ou nível descritivo

n – Tamanho da amostra

IC – Intervalo de confiança

h – Horas

TC – Tomografia computadorizada

CIISA – Centro interdisciplinar de investigação em saúde animal

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

SSA – Amilóide sérica A

Hp - Haptoglobina

AGP - α -1-glicoproteína ácida

TNF α - Factor de necrose tumoral α

Th1 – Tipo de resposta celular

Th2 – Tipo de resposta humoral

DnaK – Proteína de choque térmico do *Mycoplasma haemofelis*

HspA1 – Antígeno de *Mycoplasma suis*

FCV – *Feline calicivirus*

FHV-1 – *Feline herpesvirus 1*

AAFP-AAHA - American Animal Hospital Association e American Association of Feline Practitioners

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

NCBI – *National Centre for Biotechnology Information*

FWD - *Forward*

REV - *Reverse*

dNTPs – Nucleótidos utilizados nas reacções de PCR

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

(M:E) - Rácio mielóide eritróide

Ht - Hematócrito

p.e. – Por exemplo

°C – Graus Célsios

q – a cada

PO – Per os, ou seja, por via oral

Pb – Pares de base

1. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS

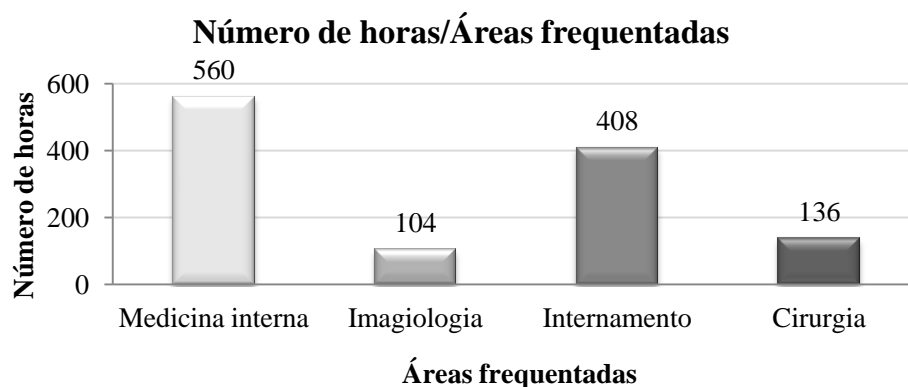
1.1 Actividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular

De forma a concluir o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizei o meu estágio curricular com a duração de 6 meses no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa. Este decorreu de 1 de Março a 30 de Agosto sob a orientação do Professor Doutor José Henrique Duarte Correia, e co-orientação da Professora Doutora Ana Duarte.

Actualmente, o hospital encontra-se em funcionamento 24 horas (h) por dia e, como tal, o horário estipulado para os estagiários seguiu um carácter rotativo, não só entre as diferentes áreas, mas também entre os diferentes turnos. Para o efeito, foram considerados dois turnos de 8 horas diárias, a funcionar das 9h às 17h e das 13h às 21h. Foram ainda estabelecidos alguns turnos de 24 horas para a área do internamento, de modo a que houvesse sempre um estagiário responsável pelo auxílio ao médico veterinário, enfermeiros e auxiliares no local.

O estágio estava então dividido e centrado em torno de quatro grandes áreas da clínica de animais de companhia e animais exóticos e, como tal, tive a oportunidade de frequentar alternadamente a área da medicina interna, a imagiologia, o internamento e a cirurgia, num total de 1208 horas aproximadamente. De todas as áreas frequentadas, a área da medicina interna e do internamento foram aquelas onde passei mais tempo e observei maior número de casos. (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Distribuição do número de horas despendido consoante a área frequentada ao longo do estágio.



Na área da medicina interna (Figura 1), tive a oportunidade de iniciar e conduzir as consultas com os proprietários dos animais, relembrando todos os conhecimentos previamente adquiridos acerca da anamnese, história clínica, contenção e exame físico dos animais. De seguida, era discutido com o médico veterinário assistente, a lista de problemas, os diagnósticos diferenciais, os exames complementares a realizar, o diagnóstico e o respectivo tratamento. Ainda nas consultas, pude aprender e melhorar algumas das técnicas mais utilizadas na rotina da clínica, como a recolha de sangue e de outros materiais biológicos para a realização de exames complementares de diagnóstico, aplicação de vacinas e medicação segundo as diferentes vias de administração, algaliação, visualização do conduto auditivo e limpeza do mesmo, colocação de cateteres e montagem do sistema de fluidoterapia. Tive ainda a oportunidade de assistir e auxiliar nas colheitas de sangue para o Banco de Sangue Veterinário da FMV.

Figura 1 – Sala de consultas do hospital escolar veterinário da FMV



Da totalidade das consultas assistidas nesta área, uma grande parte correspondeu sem dúvida à medicina preventiva, onde figuram as acções de vacinação e desparasitação, e às consultas de novos animais de companhia, onde são transmitidos todos os cuidados e conselhos a ter com o novo animal. Foram também comumente observados casos de patologia digestiva representados maioritariamente por quadros de gastroenterite por diversos motivos; origem infecciosa, como a parvovirose e leishmaniose no cão, e o vírus da imunodeficiência felina e/ou vírus da leucemia felina no gato (FIV/FelV); metabólica, onde figuraram maioritariamente casos de insuficiência renal crónica e de *diabetes mellitus* cada vez mais frequentes na prática clínica; e de patologia neoplásica, onde se verificou maior incidência da neoplasia mamária nas fêmeas. Com menor frequência, pude ainda assistir a consultas de urgência, e auxiliar toda a equipa na estabilização do paciente, com vista a uma posterior avaliação clínica.

O hospital conta ainda com alguns clínicos responsáveis por consultas de especialidade na área da oftalmologia, dermatologia, endocrinologia, neurologia, oncologia e comportamento animal, onde acompanhei a avaliação e evolução dos animais na resposta ao tratamento instituído.

Especialmente nesta área onde existe uma maior proximidade com os proprietários, e considerando a actual diminuição do poder económico dos mesmos, tive a oportunidade de

reforçar e aperfeiçoar as minhas faculdades de comunicação, que se revelam de enorme importância e que ditam a continuidade de uma boa relação entre o médico e o proprietário.

Na área da imagiologia (Figura 2) pude participar e auxiliar na realização de radiografias, ecografias, endoscopias e tomografia computadorizada (TC), sendo que nas duas últimas o número de casos observados foi menor. Na radiologia e ecografia pude ajudar sobretudo ao nível da contenção e posicionamento do animal, da administração de sedativos e/ou tranquilizantes, e da cateterização e entubação para anestesia, que muitas vezes é necessária à realização destes exames. Ainda na ecografia, assisti à realização de biópsias eco-guiadas e de cistocenteses para colheita de urina, e tive também a oportunidade de estar presente em duas endoscopias com recolha de corpos estranhos ao nível do estômago. Nesta área tive a oportunidade de aumentar e reforçar o conhecimento sobre a visualização e interpretação das imagens obtidas e sobre a importância da utilização destas técnicas no diagnóstico.

Na área do internamento vigora sobretudo o acompanhamento diário e a monitorização do animal doente, como forma de assegurar o fornecimento constante da medicação e alimentação prescritas, a limpeza e o bem-estar do animal. Todos eles eram monitorizados e passeados 3 a 4 vezes por dia, sendo avaliado o pulso, o tempo de repleção capilar, a temperatura, a frequência cardíaca e respiratória, assim como quaisquer alterações na urina e fezes do animal. Nesta área pude ainda realizar alguns procedimentos como a medição da pressão arterial, a colheita de sangue e outros materiais biológicos para novos exames de monitorização, a fisioterapia, a realização de enemas e preparação para outros procedimentos muitas vezes cirúrgicos, a colocação de cateteres e tubos esofágicos, a limpeza de feridas e mudança de pensos, a realização de transfusões sanguíneas e curvas de glicémia, entre outros. (Figura 3)

Figura 2 – Sala de radiologia do hospital escolar veterinário da FMV –



Figura 3 – Ala de internamento do hospital escolar veterinário da FMV –

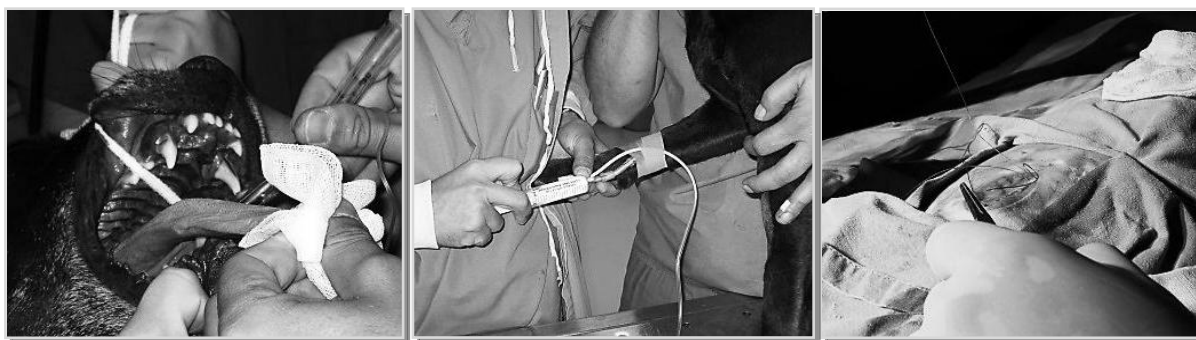


Na área da cirurgia, procedíamos inicialmente à recepção dos animais, preenchimento das fichas de internamento, pesagem e sedação. Em algumas cirurgias que necessitavam de radiografia ou TC prévios, os animais eram anestesiados e os exames eram efectuados antes dos animais descerem para a sala de preparação cirúrgica; os restantes eram levados directamente para esta sala onde eram anestesiados e pré-medicados com antibiótico e analgésico (Figura 4). Era ainda nesta sala que ajudava na preparação do animal através da tricotomia, lavagem e desinfeção da zona cirúrgica, não esquecendo a monitorização das constantes vitais. Uma vez na sala de cirurgia, podia tomar o papel de ajudante de cirurgião, onde realizava algumas funções, como a limpeza do campo cirúrgico, o controlo de pequenas hemorragias, a manipulação de alguns órgãos e por vezes, a sutura da pele; o papel de anestesista, onde monitorizava constantemente a coloração das mucosas, o tempo de repleção capilar, o pulso, o valor das frequências cardíacas e respiratórias e o grau da anestesia; ou o papel de circulante, onde podia ajudar na preparação do cirurgião e do seu ajudante e fornecia o material que fosse necessário ao longo de toda a cirurgia. Após o término da mesma, o animal era então acompanhado ao internamento para acordar em segurança, monitorizado e medicado para o controlo da dor. Nesta fase era preenchida a ficha de pós-operatório onde eram fornecidas todas as indicações e cuidados aos proprietários. Participei ainda em consultas de acompanhamento pós-cirúrgico onde normalmente se mudavam os pensos, avaliavam as suturas e se retiravam os pontos.

A maioria das cirurgias assistidas foram ovariohisterectomias, orquiectomias e mastectomias, contudo tive a oportunidade de participar e auxiliar igualmente em diversas cirurgias de tecidos moles e ortopedia.

Figura 4 - Fotografias de diferentes cirurgias assistidas ao longo do estágio curricular.

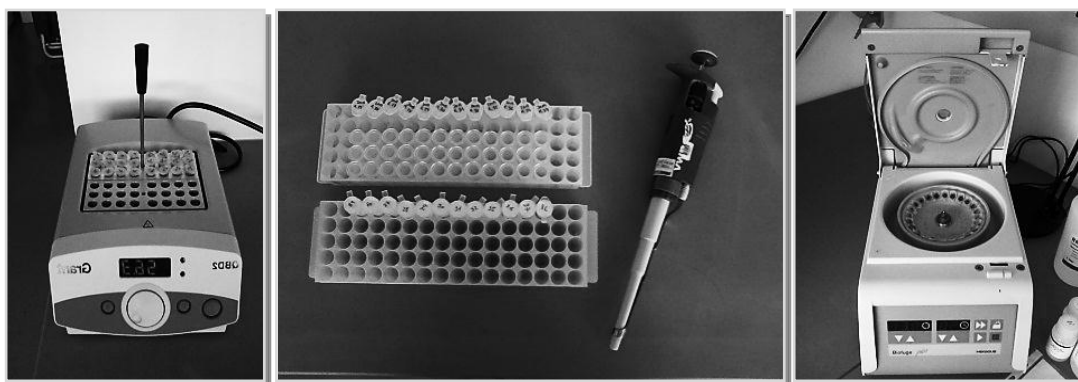
(Originais)



1.2 Actividades desenvolvidas no contexto da componente prática da presente dissertação de mestrado

A componente prática foi desenvolvida nos Laboratórios de Virologia e Biologia Molecular do CIISA, pertencentes à FMV/UL, tendo como principal objectivo a avaliação da prevalência de hemoplasmas felinos numa população heterogénea de gatos, através do rastreio molecular de amostras de sangue total. As amostras incluídas no estudo reúnem as colheitas efectuadas durante o meu último mês de estágio no Hospital Escolar da FMV-UL, um grupo de amostras provenientes de outros 3 projectos decorridos no Laboratório de Virologia da Faculdade desde 2006 e um conjunto de amostras pertencente ao Banco de Sangue Veterinário da FMV-UL. Toda a actividade laboratorial foi desempenhada após o estágio curricular, tendo sido crucial no desenvolvimento do presente estudo, onde pude não só, alcançar todos os objectivos do trabalho, mas também aprender e familiarizar-me com todas as técnicas inerentes ao mesmo. (Figura 5)

Figura 5 – Fotografias tiradas durante a realização do trabalho prático, no laboratório de virologia e Biologia Molecular da FMV-UL. (Originais)



1.3 Comunicação científica dos resultados obtidos no presente estudo

Os resultados obtidos com o presente trabalho foram apresentados sob a forma de comunicação oral, intitulada “*Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ distribution in distinct Feline Population, Portugal”, Duarte, A., Marques, V., Correia, J. H. D, Tavares, L., no congresso “Canine leishmaniasis and other vector-borne diseases: Current state of knowledge”, que decorreu de 8 a 10 de Março de 2013 em Pisa, Itália. (Anexo 10.1)

2. INTRODUÇÃO

2.1 Etiologia

Os micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos por hemoplasmas, pertencem actualmente a um conjunto restrito de bactérias gram-negativas sem parede celular, cuja particularidade reside na capacidade de ligação à superfície dos eritrócitos (Messick & Harvey, 2011). A presença destes microorganismos em gatos tem sido frequentemente associada com o estabelecimento de anemias hemolíticas moderadas a graves, razão pela qual, a doença foi inicialmente denominada por Anemia Infecciosa Felina (Flint & Moss, 1953).

A identificação dos hemoplasmas felinos foi documentada pela primeira vez em 1942 num gato anémico oriundo da África do Sul (Clark, 1942)¹. Na altura, estes microorganismos foram denominados de *Eperythrozoon fells* e só passados cerca de 10 anos se voltaram a reconhecer espécies similares em gatos provenientes dos Estados Unidos da América (Sykes, 2010a). A denominação proposta abrangia todos os microorganismos que podiam ser encontrados livres no plasma ou aderentes à superfície dos eritrócitos e que apresentavam geralmente forma de anel; tendo sido seleccionado o nome de *Haemobartonella fells* para caracterizar os microorganismos que raramente eram observados livres no plasma e que podiam apresentar diversas morfologias (Sykes, 2010a).

Numa primeira fase, estes microorganismos incluídos nos géneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, foram inseridos na ordem *Rickettsiales*. Esta classificação tinha como base o tamanho diminuto dos microorganismos, o parasitismo intracelular obrigatório, a capacidade de aderir às células eritrocitárias, a impossibilidade de proceder à sua cultura em laboratório e a suspeita de transmissão por vectores artrópodes (Sykes, 2010a, 2010b; Tasker, 2010).

Com a continuidade dos trabalhos realizados, é mais tarde descoberta a presença de um isolado da *Haemobartonella fells*, num gato co-infectado com o vírus da leucemia felina (FeLV). Este microorganismo inicialmente denominado como forma pequena ou variante californiana da *Haemobartonella fells*, apresentava cerca de metade do tamanho do primeiro, e um grau de patogenicidade bastante inferior (Foley, Harrus, Poland, Chomel, & Pedersen, 1998).

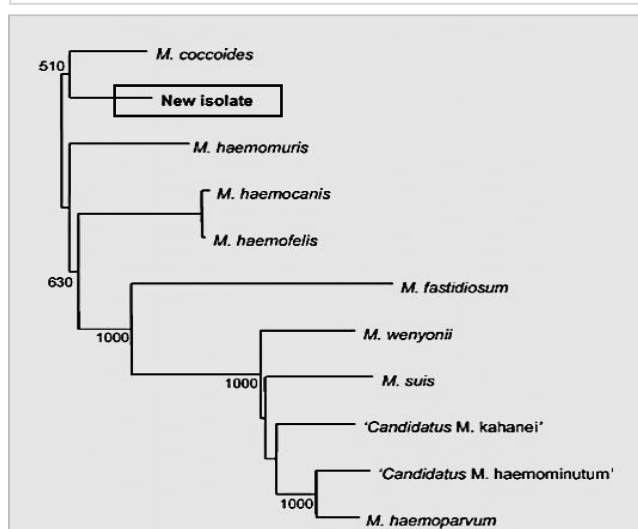
A identificação de novas espécies foi conseguida através da amplificação, sequenciação e análise filogenética do gene codificante da subunidade 16S do RNA ribossómico, que permitiu ainda, a reclassificação destes organismos, clarificando a proximidade filogenética entre estes e as espécies pertencentes ao género *Mycoplasma* (Neimark, Johansson, Rikihisa,

¹Citado por: Sykes, 2010b.

& Tully, 2001; Rikihisa et al., 1997). Além das evidências moleculares, estes microorganismos apresentavam outras características semelhantes entre si, como o tamanho diminuto das células (0.3-0.8µm) e dos seus genomas, os exigentes requisitos de cultura, a resistência à penicilina e susceptibilidade às tetraciclinas, a forma esférica e a ausência de parede celular e flagelos que lhes é característica (Neimark et al., 2001; Tasker, 2010). A inclusão destas bactérias no género *Mycoplasma* é levada a cabo apesar de toda a controvérsia gerada, tendo sido, no entanto, proposta a designação de “hemoplasmas” para caracterizar e diferenciar todo este grupo recente de microorganismos com capacidades hemotrópicas (Neimark et al., 2001; Uilenberg, Thiaucourt, & Jongejan, 2004). A espécie conhecida até então como *Haemobartonella felis* passou a ser designada por *Mycoplasma haemofelis*, (*Mhf*) (Neimark, Johansson, Rikihisa, & Tully, 2002) e o seu isolado, previamente denominado como forma pequena ou variante californiana da *Haemobartonella felis*, tomou a designação de “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (*CMhm*) (Foley & Pedersen, 2001). Esta designação reflecte o carácter provisório da classificação destes microorganismos, uma vez que a sua caracterização tem sido impossibilitada pelo facto de permanecer inacessível a sua cultura em laboratório (Tasker, 2010). Com a inclusão dos hemoplasmas no género *Mycoplasma*, e através da amplificação da subunidade 16S do RNA ribossómico, foram também reclassificados os isolados de cada espécie, descobertos em diferentes localidades. Os microorganismos outrora classificados como isolados da Austrália, Florida, Ohio, Oklahoma, e Illinois da *Haemobartonella felis* passaram a pertencer aos isolados do *Mhf* e os microorganismos identificados como isolados da Califórnia e Birmingham, passaram a caracterizar os isolados do *CMhm* (Clark, Foster, & Spencer, 2002; Tasker et al., 2001).

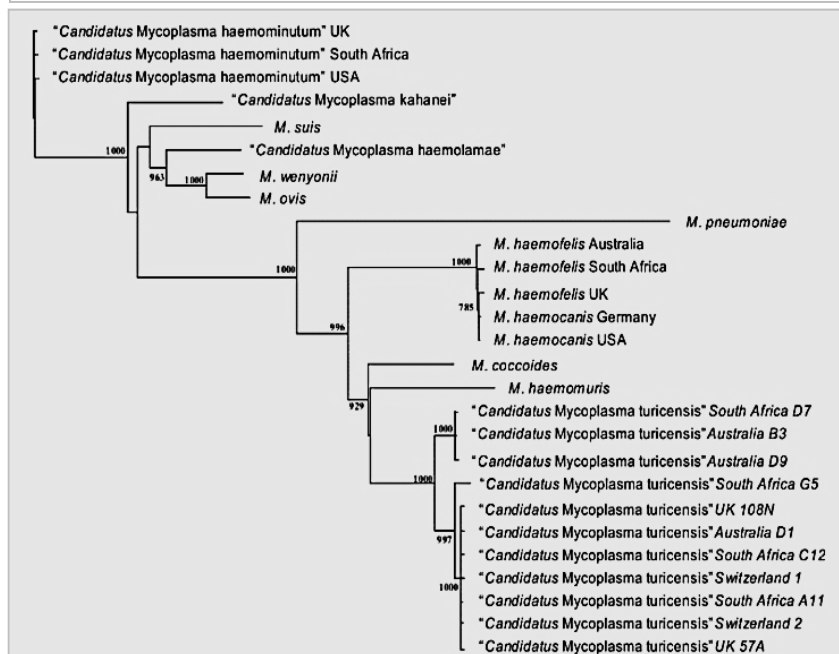
A realização de estudos epidemiológicos em diferentes localizações geográficas permitiu a descoberta de duas novas espécies de hemoplasmas (Figura 6), denominadas por “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (*CMt*) (Willi et al., 2005) e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (*CMhp*), (Sykes, Drazenovich, Ball, & Leutenegger, 2007b) que, à semelhança das restantes espécies, foram já documentadas em diversas regiões do mundo (Martinez-Diaz et al., 2013; Sykes, 2010a).

Figura 6 - Árvore filogenética que mostra a relação entre o novo isolado e as restantes



A análise filogenética do gene 16S do RNA ribossômico permitiu ainda a detecção da elevada proximidade evolutiva do *Mhf* e do *CMhm* com os hemoplasmas caninos, e do *CMt* com os hemoplasmas dos roedores (Birkenheuer, Breitschwerdt, Alleman, & Pitulle, 2002; Sykes, Ball, Bailiff, & Fry, 2005; Willi et al., 2005), assim como a elevada proximidade genética entre os isolados de cada espécie de hemoplasmas felinos e a variação entre espécies, que as coloca em diferentes subgrupos dentro do grupo dos hemoplasmas (Figura 7)

Figura 7 - Análise filogenética do gene 16S rRNA dos isolados de CMt e dos microorganismos relacionados (Willi



(Tasker et al., 2003a; Willi et al., 2006b).

Os hemoplasmas felinos, inicialmente incluídos no grupo *pneumoniae*, (Neimark et al., 2001) foram recentemente colocados num ramo único, tendo-se verificado uma maior proximidade genética destes com o *Mycoplasma fastidiosum* (Peters et al., 2008b). As espécies foram ainda divididas em dois grupos distintos de acordo com a proximidade genética, tendo sido incluídos no grupo *haemofelis*, o *Mhf* e o *CMt*, que possuem 88% de identidade genética entre si, enquanto, que o grupo *haemominutum* é apenas constituído pelos isolados do *CMhm* que apresentam 83% de semelhança genética com as outras duas espécies de hemoplasmas (Foley & Pedersen, 2001; Peters et al., 2008b; Willi et al., 2006a).

Recentemente foram caracterizados os genomas completos do *Mhf* (Barker et al., 2011a; Santos et al., 2011) e do *CMhm*, (Barker et al., 2012) fornecendo dados importantes acerca da existência de potenciais proteínas imunogénicas, de factores de patogenicidade e de possíveis mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro. Estes trabalhos reportam ainda a existência de vias metabólicas limitadas nestes microorganismos, que se encontram dependentes do meio ambiente e do hospedeiro para sobreviver. Este factor pode justificar a dificuldade em desenvolver e propagar estes microorganismos in vitro (Barker et al., 2011b), como documentado recentemente para o *Mycoplasma Suis* (*M.suis*) (Schreiner et al., 2012). Embora o genoma do *Mhf* apresente um tamanho relativamente pequeno (1 155 937 pb),

contém uma rede extensa de genes parálogos (Santos et al., 2011), possivelmente envolvidos no desenvolvimento da diversidade antigénica que o microorganismo manifesta. A expressão de diferentes epitopos antigénicos, conhecida como variação de fase, resulta na evasão à resposta imunitária do hospedeiro, explicando eventualmente as flutuações cíclicas de bacteriémia provocadas pelo *Mhf* (Santos et al., 2011).

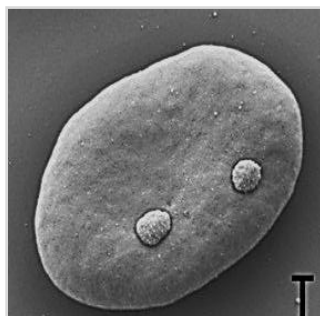
A avaliação genómica do *CMhm* é ainda limitada. Foi identificado um pequeno número de proteínas funcionais, algumas das quais com maior homologia em relação ao *M. suis*, mas não a outros hemoplasmas, sugerindo um ancestral comum. Foram também identificados genes parálogos no seu genoma, embora em menor número comparativamente com *Mhf*, e um metabolismo energético igualmente restrito (Barker et al., 2012).

Trabalhos recentes envolvem ainda a caracterização dos antígenos e da resposta humoral à infecção por hemoplasmas (Messick & Santos, 2011; Peters, Helps, Gruffydd-Jones, Day, & Tasker, 2010) e o desenvolvimento e aplicação de um teste imunoenzimático, baseado num antígeno recombinante de *Mhf* para detecção de anticorpos em gatos infectados experimentalmente (Barker et al., 2010; Novacco et al., 2011; Wolf-Jäckel et al., 2010). Este antígeno pode vir a ser utilizado no desenvolvimento de testes serológicos de diagnóstico rápido para uso na clínica (Wolf-Jäckel et al., 2010), permitindo a avaliação e quantificação do título de anticorpos específicos e o emprego atempado da terapêutica. O seu estudo pode servir ainda para a formulação de vacinas (Messick & Santos, 2011); no entanto, são necessários mais estudos para avaliar a reactividade cruzada deste antígeno com anticorpos dirigidos contra outros agentes bacterianos e o benefício da sua utilização nas infecções adquiridas por via natural (Novacco, Wolf-Jäckel, Riond, & Hofmann-Lehmann, 2012a; Wolf-Jäckel et al., 2010).

2.2 Morfologia

A visualização de hemoplasmas felinos por microscopia óptica, e sobretudo por microscopia electrónica (ME), tem permitido a caracterização morfológica destes microorganismos. Através desta última técnica pode observar-se a localização epicelular do *Mhf* (Figura 8), parcialmente cravado numa depressão da superfície dos eritrócitos (Jain & Keeton, 1973). Pode ainda visualizar-se a heterogeneidade morfológica destes microorganismos pela observação de formas discóides, cocóides, cónicas, cilíndricas e forma de *donuts*, bem como confirmar-se a alteração morfológica dos eritrócitos infectados que acabam por perder a forma bicôncava que lhes é característica (Messick & Harvey, 2011).

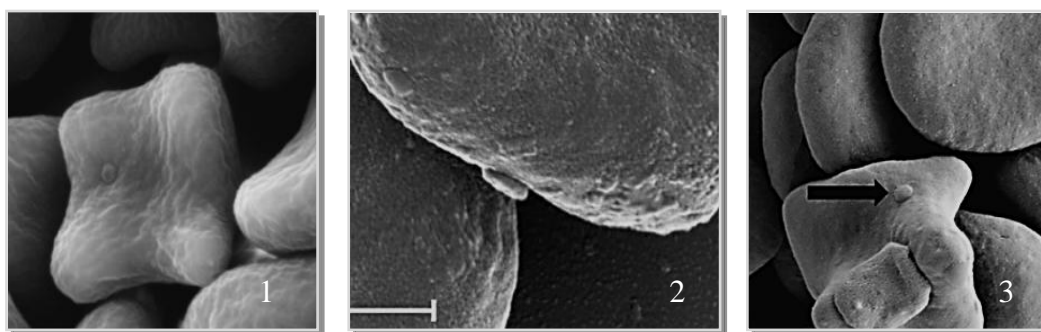
Figura 8 – Visualização de *Mhf* aderente à superfície dos eritrócitos por ME (Willi et al., 2011 – J. Veterinary Microbiology).



O *Mhf* é envolvido por uma única membrana, que apresenta fibrilas responsáveis pela sua ligação à superfície dos eritrócitos em determinados pontos; e embora não tenham sido reconhecidos organelos citoplasmáticos, alguns microorganismos parecem conter grânulos que variam de tamanho e densidade (Messick & Harvey, 2011). Com exceção do tamanho reduzido, o *CMhm* apresenta características ultra-estruturais semelhantes ao *Mhf*, possuindo apenas uma membrana plasmática limitante, sem evidência de parede celular e estruturas internas membranosas (Foley & Pedersen, 2001).

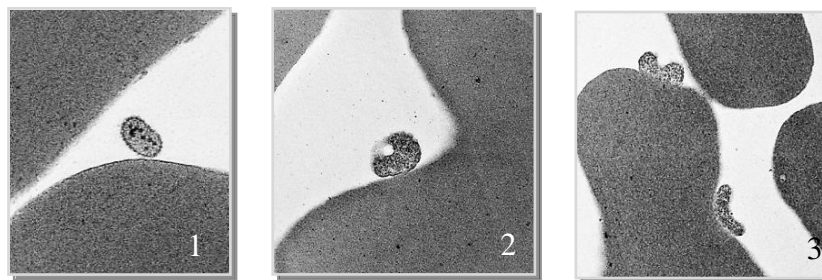
A caracterização morfológica do *CMhm* e *CMt* foi recentemente conseguida através de microscopia electrónica de alta resolução, observando-se a presença de microorganismos em forma de disco, com cerca de 0.3µm de diâmetro aderentes à superfície dos eritrócitos (Willi et al., 2011). (Figura 9)

Figura 9- Visualização de *CMhm* (1) e *CMt* (2 e 3) aderentes à superfície dos eritrócitos por ME (Willi et al., 2011 - J. Veterinary Microbiology).



O *CMt* foi ainda visualizado com recurso a microscopia electrónica de transmissão (MET) próximo da superfície de um eritrócito. (Figura 10) Este microorganismo com 0.25 µm de diâmetro apresentava uma forma ovalada com diversas estruturas electro densas no seu interior (Willi et al., 2011).

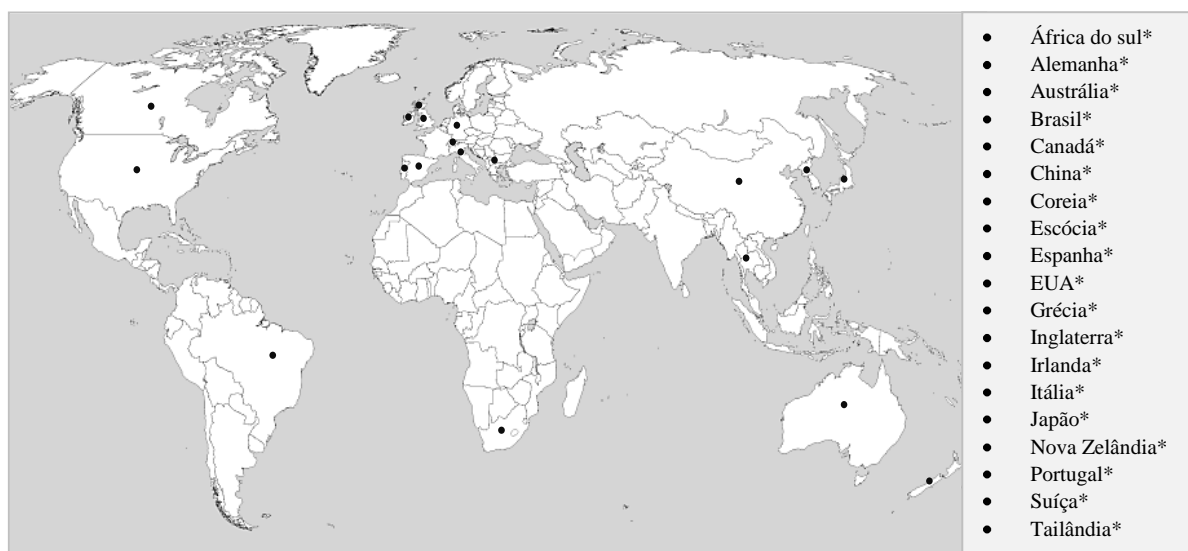
Figura 10 - Visualização de hemoplasmas por MET. 1 - *CMt* próximo da superfície dos eritrócitos; 2 e 3 - *Mhf* aderente à superfície dos eritrócitos (Willi et al., 2011 - J. Veterinary Microbiology).



2.3 Prevalência

A distribuição dos hemoplasmas felinos encontra-se generalizada a todo o globo, (Figura 11) com prevalências a variar de acordo com a localização geográfica considerada (Sykes, 2010a, 2010b; Tasker, 2010). A presença destes microorganismos, além de detectada em felinos domésticos, tem sido igualmente identificada em várias espécies de animais selvagens (Krengel et al., 2013; Willi et al., 2007b).

Figura 11 – Distribuição mundial dos hemoplasmas felinos com base na literatura revista (Imagem retirada de: http://www.santiago.pro.br/mapas/mundo/mundo_mudo_carto.JPG).



*Fontes: (Assarasakorn et al., 2012; Bennett, Gunn-Moore, Brewer, & Lappin, 2011; Braga, André, Freschi, Teixeira, & Machado, 2012; Gentilini et al., 2009; Juvet, Lappin, Brennan, & Mooney, 2010; Laberke, Just, Pfister, & Hartmann, 2010; Lobetti & Lappin, 2012; Maher et al., 2010; Martinez-Diaz et al., 2013; Novacco, Riond, Meli, Grest, & Hofmann-Lehmann, 2013; Peters, Helps, Willi, Hofmann-Lehmann, & Tasker, 2008a; Roura et al., 2010; Stojanovic & Foley, 2011; Sykes, Terry, Lindsay, & Owens, 2008a; Tanahara et al., 2010; Tasker et al., 2004a; Willi et al., 2006c; Yu et al., 2007)

Embora o *Mhf* seja considerado a espécie mais patogénica, é aquele que aparece com menor prevalência (Kamrani, Parreira, Greenwood, & Prescott, 2008; Macieira et al., 2008; Sykes et al., 2008a; Tasker et al., 2003b; Willi et al., 2006a), sendo encontrado em apenas 0.5% a 5% dos gatos doentes que visitam os hospitais veterinários (Sykes, 2010a). No entanto, e atendendo ao facto de que as prevalências variam consoante a região geográfica considerada, esta espécie surge com maior expressão num estudo efectuado no Canadá (Kamrani et al., 2008), com prevalências de 47% em gatos de vida livre, e chega a assumir valores superiores ao *CMt* que é, em alguns locais, o menos frequente das três espécies de hemoplasmas (Fujihara, Watanabe, Yamada, Harasawa, & ocirc, 2007; Gentilini et al., 2009; Kamrani et al., 2008; Laberke et al., 2010; Peters et al., 2008a; Willi et al., 2006c).

Das espécies reconhecidas até à data, o *CMhm* é o hemoplasma felino mais frequentemente identificado através de diagnóstico molecular, tendo sido reportado em 1/5 a 1/2 dos gatos que se apresentam nos hospitais veterinários (Sykes, 2010a). A sua prevalência varia igualmente com a região geográfica considerada e com a idade dos animais atingidos, apresentando maior ocorrência nos gatos mais velhos (Gentilini et al., 2009; Messick & Harvey, 2011; Tasker et al., 2003b; Tasker et al., 2004a).

A prevalência de infecção do *CMt* é semelhante à encontrada para o *Mhf*, sendo detectado em 0,5% a 10% dos animais observados nos hospitais veterinários, consoante as regiões geográficas avaliadas (Fujihara et al., 2007; Gentilini et al., 2009; Kamrani et al., 2008; Laberke et al., 2010; Peters et al., 2008a; Santos et al., 2009; Sykes et al., 2008a; Willi et al., 2006b; Willi et al., 2006c).

O *CMhp* foi somente identificado em dois estudos até há data, com prevalências de infecção de 0.7% nos Estados Unidos da América e de 4,34% em Portugal (Martinez-Diaz et al., 2013; Sykes et al., 2007b).

Tem sido ainda reportada a presença de co-infecções duplas e triplas entre as três espécies de hemoplasmas felinos, com especial relevo para a co-infecção de *Mhf* e *CMhm*, que parece ser a mais predominante (Fujihara et al., 2007; Gentilini et al., 2009; Jensen, Lappin, Kamkar, & Reagan, 2001; Lobetti & Tasker, 2004; Luria et al., 2004; Peters et al., 2008a; Sykes et al., 2007b; Sykes et al., 2008a; Tasker et al., 2003b; Willi et al., 2006b; Willi et al., 2006c). O *CMt* tem sido frequentemente associado com a presença de outras espécies de hemoplasmas, especialmente com *CMhm* (Gentilini et al., 2009; Laberke et al., 2010; Peters et al., 2008a; Sykes et al., 2008a; Willi et al., 2006c).

2.4 Factores de risco

A infecção originada por hemoplasmas felinos varia de acordo com a espécie considerada, os isolados pertencentes a cada espécie, a via de infecção e a duração da mesma, a dose do microorganismo infectante, assim como com factores intrínsecos ao hospedeiro, como a presença de doenças concomitantes ou a infecção por retrovírus (Tasker, 2010).

De um modo geral, as infecções por hemoplasmas parecem ocorrer maioritariamente em gatos mais velhos, do sexo masculino, sem raça definida, não vacinados e de acesso livre à rua (Foley et al., 1998; Grindem, Corbett, & Tomkins, 1990; Laberke et al., 2010; Luria et al., 2004; Sykes et al., 2008a; Tasker et al., 2003b; Willi et al., 2006b; Willi et al., 2006c). Apesar da infecção ser amplamente encontrada em animais mais velhos, os animais jovens, possivelmente devido a imaturidade imunológica, parecem ser mais susceptíveis à infecção por *Mhf* com desenvolvimento e exteriorização de sinais clínicos graves (Sykes et al., 2008a; Tasker et al., 2009a). Além dos factores considerados, a infecção por *CMhm* foi também, associada com a presença de estomatite e carcinoma das células escamosas (Sykes et al., 2007b).

Alguns estudos referem ainda a existência de uma associação entre a ocorrência de infecção por hemoplasmas felinos e a infecção por retrovírus (Gentilini et al., 2009; George, Rideout, Griffey, & Pedersen, 2002; Grindem et al., 1990; Harrus et al., 2002; Laberke et al., 2010; Macieira et al., 2008; Nash & Bobade, 1986; Sykes et al., 2007b; Sykes et al., 2008a), particularmente a infecção pelo FeLV (Grindem et al., 1990; Harrus et al., 2002; Laberke et al., 2010). Ao comprometer o sistema imunitário dos animais, este vírus aumenta a sua susceptibilidade a infecções secundárias ou exacerba uma infecção latente previamente adquirida (Messick & Harvey, 2011). No entanto, estudos experimentais mencionam que a infecção por *Mhf* pode também ser um factor predisponente para contrair infecções por FeLV (Kociba, Weiser & Olsen, 1983)².

A co-infecção de *Mhf* com o FeLV resulta em anemia e sinais clínicos mais graves do que seria de esperar numa infecção provocada por apenas um destes microorganismos (Bobade, Nash, & Rogerson, 1988; Harrus et al., 2002). Contudo, a co-infecção com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) não parece desencadear anemias mais graves do que aquelas encontradas na infecção causada por *Mhf* apenas (Harrus et al., 2002; Reubel, Dean, George, Barlough, & Pedersen, 1994).

²Citado por: Messick & Harvey, 2011.

É possível que a associação entre a presença de FIV e a infecção por hemoplasmas seja detectada mais tarde, devido à imunossupressão grave que ocorre maioritariamente nos estádios avançados da infecção por FIV (Laberke et al., 2010).

As restantes espécies de hemoplasmas felinos têm sido igualmente identificadas nos animais co-infectados por retrovírus. A presença de *CMhm* tem sido fortemente associada à infecção por FIV em alguns estudos (Macieira et al., 2008), enquanto noutros se encontra maioritariamente associada com a presença de FeLV (Laberke et al., 2010), tendo-se verificado o estabelecimento de anemias mais graves nos gatos co-infectados com este último, tal como acontece nos animais co-infectados por *Mhf* (George et al., 2002). A presença de *CMt* tem sido comumente identificada em associação com outras espécies de hemoplasmas, assim como na presença de outros cofactores imunossupressores, que parecem aumentar o potencial patogénico deste microorganismo (Messick & Harvey, 2011).

2.5 Modos de transmissão

2.5.1 Transmissão por vectores artrópodes

A pulga do gato, denominada por *Ctenocephalides felis*, parece estar implicada na transmissão dos hemoplasmas felinos, com maior prevalência de detecção de *Mhf* em alguns estudos (Nash & Bobade, 1986; Woods, Brewer, Hawley, Wisniewski, & Lappin, 2005) e de *CMhm* noutros (Barrs et al., 2010; Kamrani et al., 2008; Shaw, Kenny, Tasker, & Birtles, 2004). No entanto, têm sido detectados animais portadores destes agentes, mesmo em regiões onde a infestação por pulgas não é habitual (Jensen et al., 2001).

De acordo com um estudo recente, apenas 11% dos gatos positivos a hemoplasmas obtiveram concordância entre a espécie encontrada no sangue e a espécie detectada nas respectivas pulgas. Pensa-se que a pulga do gato possa desempenhar um papel minoritário na transmissão de hemoplasmas e que a presença destes microorganismos nos artrópodes possa ser apenas justificada pela sua actividade hematófaga (Assarasakorn et al., 2012; Kamrani et al., 2008; Lappin et al., 2006; Shaw et al., 2004; Willi et al., 2007a).

Além das pulgas, foram ainda examinadas diferentes espécies de carraças, tendo sido identificado *Mhf* em carraças oriundas da Europa (Schabereiter-Gurtner, Lubitz, & Rolleke, 2003) e *CMhm* em carraças provenientes do Japão (Taroura et al., 2005). Outros estudos, no entanto, não reportaram qualquer presença de DNA de hemoplasmas em carraças não alimentadas (Willi et al., 2007a; Willi et al., 2009), salientando ainda a ocorrência de infecções em áreas suburbanas, onde o risco de exposição a carraças é menor (Sykes et al., 2007b).

Além das pulgas e carraças, pensou-se ainda que os mosquitos tivessem um papel similar (Sykes et al., 2007b; Sykes, 2010a), no entanto, um estudo realizado no Colorado demonstrou que o DNA identificado pertencia a um hemoplasma de bovino (Lin et al., 2009)³.

Apesar dos resultados pouco conclusivos, não se pode excluir a existência de um vector artrópode responsável pela transmissão destes agentes, até porque a prevalência de infecção varia consoante a região geográfica (Sykes et al., 2007b; Willi et al., 2006c) e a temperatura, tendo sido encontrada maior prevalência em regiões de climas quentes, favoráveis ao aparecimento destes vectores (Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña, & Barba-Carretero, 2003; Lobetti & Tasker, 2004; Luria et al., 2004; Tasker et al., 2004a). Um dos factores que também pode contribuir para a ideia de que a transmissão possa ser levada a cabo por vectores artrópodes é a elevada semelhança genética encontrada entre as espécies de hemoplasmas dos felinos selvagens e as espécies encontradas nos felídeos domésticos. Este facto, sugere que os animais selvagens possam funcionar como reservatórios da infecção, posteriormente transmitida aos gatos domésticos por vectores artrópodes (Willi et al., 2007b). A confirmação directa deste tipo de transmissão continua por fazer, devendo ser considerada a existência de outros factores (Tasker, 2010).

2.5.2 Transmissão horizontal

Tendo em conta que a infecção por hemoplasmas ocorre maioritariamente em gatos do sexo masculino, com acesso livre à rua e, de acordo com alguns autores, debilidade do sistema imunitário por retrovírus, a possibilidade de que a transmissão se encontre relacionada com as lutas e mordeduras que frequentemente se desencadeiam nestes animais tem sido considerada. A existência de uma associação entre a infecção por hemoplasmas felinos e a ocorrência de abcessos por mordedura tem sido referida como um dos factores precedentes à instalação da hemoplasmose (Grindem et al., 1990). No entanto, não é possível determinar se a infecção detectada após a mordedura se deve a uma infecção primária ou apenas a uma reactivação da infecção, originada pela mordedura ou pelo stress da situação (Sykes, 2010a). Como forma de corroborar esta hipótese, foram efectuados estudos de transmissão em gatos infectados experimentalmente, tendo sido detectada a presença de *CMt*, numa fase precoce da infecção, na saliva e na mucosa anal (Willi et al., 2007a), e a presença de *CMhm* na saliva e nas glândulas salivares dos animais infectados (Dean, Helps, Gruffydd Jones, & Tasker, 2008). Nos gatos infectados por via natural, foi identificada a presença de *Mhf* isoladamente e em associação com *CMhm* na mucosa oral (Bennett et al., 2011) dos animais.

³Citado por: Sykes, 2010b.

Trabalhos antigos reportam a ocorrência de transmissão oral através da ingestão de 2-5ml de sangue (Flint, Roepke, & Jensen, 1959); Contudo, volumes mais pequenos de sangue infectado por *CMt* não foram posteriormente transmitidos por esta via (Museux et al., 2009). A inoculação oro-nasal e subcutânea de saliva positiva a *CMt* também não conduziu a infecção nos gatos receptores, verificando-se positividade apenas com a inoculação subcutânea de sangue contaminado (Museux et al., 2009). A transmissão subcutânea de pequenos volumes de sangue infectado com *Mhf* foi também documentada (Baumann, Novacco, Riond, Boretti, & Hofmann-Lehmann, 2013), sugerindo que, embora pareça improvável a transmissão destes agentes através do comportamento de grooming e do contacto social, determinados comportamentos agressivos entre animais, com ocorrência de pequenas hemorragias, podem ser responsáveis pela transmissão (Baumann et al., 2013; Museux et al., 2009).

2.5.3 Transmissão iatrogénica por transfusão de sangue

A transfusão sanguínea, por vezes necessária em animais doentes, pode estar igualmente implicada na transmissão de hemoplasmas felinos (Wardrop et al., 2005; Willi et al., 2006c), sobretudo quando esta transmissão ocorre com sangue fresco contaminado. No entanto, quando a transfusão é efectuada com produtos armazenados, a capacidade infectante do microorganismo depende da sua viabilidade e da capacidade do animal em debelar a infecção (Tasker, 2010). De acordo com os resultados de um estudo efectuado em sangue armazenado (Gary, Richmond, Tasker, Hackett, & Lappin, 2006), não foram encontrados quaisquer hemoplasmas nos animais que receberam os produtos com um mês de armazenamento. Contudo, verificou-se que o *Mhf* pode ser transmitido quando o produto é administrado até uma hora após a sua colheita e que o *CMhm* pode ser transmitido até uma semana após o seu armazenamento. Estes parâmetros devem ser alvo de investigação, uma vez que noutros estudos realizados a viabilidade dos hemoplasmas no sangue colhido em EDTA ou heparina era muito curta (Tasker, 2010), não sendo detectadas infecções nos animais receptores, quando o sangue era inoculado uma hora após colheita. A viabilidade destes microorganismos dentro e fora do hospedeiro deve ser avaliada, tornando-se imprescindível a realização de despistes moleculares periódicos, sobretudo nos dadores que frequentam os bancos de sangue veterinários (Sykes, 2010b). A exclusão de todos aqueles que apresentam positividade a qualquer uma das espécies de hemoplasmas não está ainda padronizada, atendendo à variação da sua patogenicidade e à elevada prevalência de gatos infectados por *CMhm* (Sykes, 2010b). A presença desta espécie em animais esplenectomizados e tratados com glucocorticóides não foi relacionada com a presença de anemia, levando-nos a repensar no potencial patogénico da

espécie e na dúvida da sua exclusão/permissão em animais dadores de sangue (Sykes, Henn, Kasten, Allen, & Chomel, 2007a). No entanto, atendendo aos factores de risco da infecção e à possibilidade de existir variação entre os isolados de cada espécie, encontra-se recomendada a obtenção de um resultado negativo para todas as espécies de hemoplasmas para efeitos de transfusão (Sykes, 2010b).

2.5.4 Outros modos de transmissão

Apesar de não confirmada, foi sugerida a possibilidade de ocorrência de transmissão vertical de hemoplasmas felinos da gata para a sua descendência, quer durante a gravidez, quer durante o parto ou ainda através da lactação (Messick & Harvey, 2011; Sykes, 2010a; Tasker, 2010). Teoricamente poderia ainda ocorrer transmissão iatrogénica destes agentes entre animais hospitalizados, através da manipulação de fómites e de sangue de animais infectados, sobretudo em condições incorrectas de desinfeção e higienização (Tasker, 2010).

2.6 Patogénese

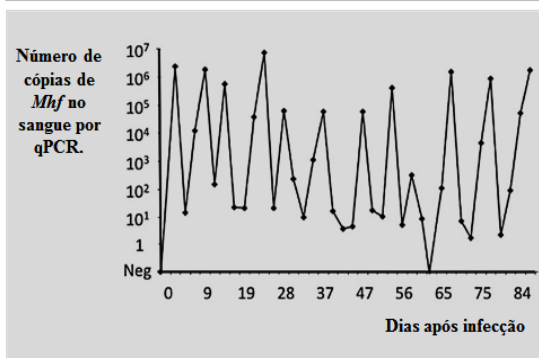
A patogénese do *Mhf* varia consoante as diferentes populações de gatos consideradas, podendo instalar-se uma anemia moderada com ausência de sinais clínicos ou, na pior das hipóteses, desencadear-se depressão e anemia graves que culminam com a morte do animal (Messick & Harvey, 2011). Após a instalação da infecção, alguns autores consideram a existência de quatro estadios de doença, denominados por, fase de pré-bacteriémia, fase aguda, fase de recuperação e fase de portador (Harvey & Gaskin, 1977).⁴ Assim, após a inoculação experimental deste microorganismo em gatos, começa a desenvolver-se a fase de pré-bacteriémia que dura cerca de 1 a 3 semanas. A fase aguda da doença compreende o tempo decorrido entre a primeira e a última detecção de cargas bacterianas elevadas, e abrange cerca de 34 dias, dentro dos quais normalmente surgem os sinais clínicos da doença (Messick & Harvey, 2011; Sykes, 2010a) e pode ser detectada a presença do microorganismo por análise citológica dos esfregaços sanguíneos (Foley et al., 1998; Sykes, 2010b).

Os gatos experimentalmente infectados por hemoplasmas exibem um aumento rápido da carga dos microrganismos logo após o estabelecimento da infecção, alcançando um pico por volta das 2 a 4 semanas (Tasker, 2010). No entanto, no caso do *Mhf*, este aumento súbito é normalmente acompanhado por uma queda abrupta do número de microrganismos, logo no período que se segue à infecção. (Figura 12) Em alguns animais estas flutuações podem permanecer durante meses, facto que deve ser tido em conta aquando da interpretação dos resultados (Messick & Harvey, 2011; Tasker, 2010).

⁴Citado por: Messick & Harvey, 2011.

Nesta fase, os microorganismos podem desaparecer do sangue em menos de duas horas, tendo-se observado uma diminuição do número de eritrócitos infectados nos esfregaços sanguíneos, de 90% para 1% em menos de 3 horas (Alleman, Pate, Harvey, Gaskin, & Barbet, 1999; Sykes, 2010b). A razão para a variação brusca do número de cópias de *Mhf* não está ainda completamente esclarecida. As causas apontadas para o seu aparecimento incluem, o

Figura 12 – Flutuações da carga de *Mhf* após infecção (Adaptado de



sequestro e subsequente libertação dos microorganismos pelos tecidos (Tasker, 2010), a variação antigénica cíclica utilizada na evasão dos microorganismos à resposta imunitária do hospedeiro (Alleman et al., 1997; Razin, Yogev, & Naot, 1998), ou a remoção e subsequente multiplicação dos microorganismos residuais no sangue (Tasker, 2010). Das causas apontadas, a primeira não parece ser responsável pelas oscilações verificadas, com base nos resultados de alguns estudos, onde não foi possível confirmar a presença de *Mhf* nos tecidos após a sua inoculação experimental (Peters et al., 2011; Tasker et al., 2009b). A segunda hipótese parece a mais provável, tendo em conta a descoberta de famílias de genes parálogos no genoma desta espécie, capazes de provocar variação de fase e/ou variação antigénica, possivelmente envolvidas nos episódios cíclicos de infecção e persistência da mesma (Santos et al., 2011). Embora a variação antigénica possa explicar as flutuações de bacteriémia, não explica o declínio dos microorganismos ao longo do tempo, presumindo-se que o hospedeiro consiga estabelecer uma resposta contra os antígenos mais constantes, mantendo uma carga bacteriana baixa; ou que se verifique uma reacção cruzada entre os anticorpos e os antígenos variáveis, controlando parcialmente as crises de bacteriémia. Outra explicação possível é que a carga elevada e prolongada do microorganismo resulte numa desregulação funcional de células T CD4 + específicas na resposta celular (Santos et al., 2011). Independentemente da sua origem, as oscilações da carga parecem implicar uma modificação nos valores do hematócrito, que variam numa ordem de valores inversa, ou seja, ao aumento súbito do número de microorganismos no sangue, corresponde uma diminuição súbita dos valores do hematócrito e vice-versa (Messick & Harvey, 2011). Estas flutuações ocorrem principalmente por hemólise extravascular, que é iniciada com o sequestro dos eritrócitos infectados pelos macrófagos do baço e do fígado, e em menor proporção pelos macrófagos dos pulmões e da medula óssea (Messick & Harvey, 2011; Tasker, 2010). Pode ocorrer também, ainda que em menor escala, uma hemólise intravascular devido ao efeito lítico dos microorganismos sobre

os eritrócitos, culminando no aumento da fragilidade osmótica das suas membranas e consequentemente, na sua destruição (Hornok et al., 2008; Willi et al., 2005). Pensa-se também que a competição por nutrientes e os mecanismos de evasão ao sistema imunitário possam conduzir à diminuição da produção de energia pelos eritrócitos, provocando stress oxidativo e diminuição do tempo de vida destas células, com a consequente remoção da circulação. De uma forma similar ao que ocorre na infecção provocada por *M. suis* (Felder et al., 2011), a depleção energética e o stress oxidativo parecem incitar a autodestruição programada destas células (Santos et al., 2011).

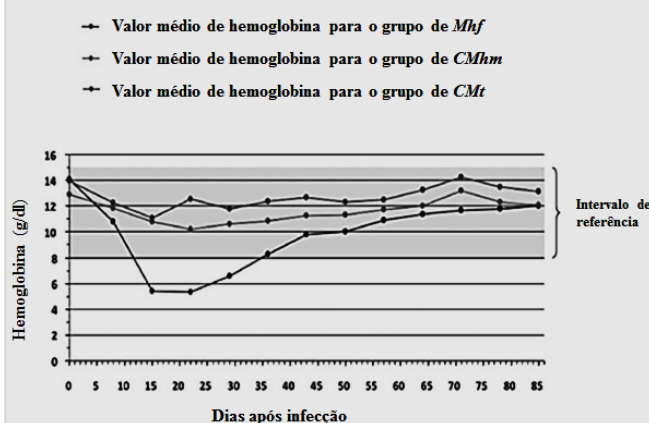
Contrariamente ao que acontece na infecção experimental, alguns estudos reportam a ausência de associação entre a presença do microorganismo e a ocorrência de anemia quando ocorre exposição natural ao agente (Willi et al., 2006c). Pensa-se que a disparidade de resultados possa dever-se à diferença da população testada, aos diferentes isolados e/ou ao carácter da infecção (Willi et al., 2006c).

A fase de recuperação inicia-se após o último grande pico de bacteriémia e culmina quando o animal consegue montar uma resposta imunitária eficaz contra o agente, com estabilização dos valores de hematócrito próximo dos limites de referência (Messick & Harvey, 2011).

Contrariamente ao que acontece com o *Mhf*, a infecção provocada por *CMhm* e *CMt* geralmente não é acompanhada de anemia hemolítica moderada a grave (Tasker, 2010). (Figura 13)

Figura 13 - Média representativa dos valores da hemoglobina em três grupos de gatos infectados com cada uma das três espécies de hemoplasmas felinos, verificando-se que apenas os animais infectados por *Mhf* exibem valores inferiores aos limites de referência

(Adaptado de Tasker, 2010)



A patogenicidade do *CMhm* torna-se difícil de padronizar, tendo em conta as diferentes populações de animais testadas, os diferentes isolados, e indubitavelmente, as diferentes respostas imunitárias do animal portador. No entanto, a grande maioria das infecções provocadas por esta espécie apresenta um carácter crónico, sem evidência de sintomatologia associada (Messick & Harvey, 2011). De acordo com algumas pesquisas, podem existir bacteriémias substanciais ao longo da infecção, conduzindo, no entanto, a ligeiras alterações

no hematócrito (Foley et al., 1998; Sykes et al., 2007b; Tasker, Helps, Day, Gruffydd-Jones, & Harbour, 2003c; Tasker et al., 2009a; Westfall, Jensen, Reagan, Radecki, & Lappin, 2001). Ao contrário do que se verifica com o *Mhf*, nesta espécie não se verificam variações cíclicas marcadas da carga de microorganismos, atingindo o pico cerca de um mês após infecção experimental (Messick & Harvey, 2011).

De acordo com os resultados de um estudo recente, realizado em animais co-infectados com FeLV e *CMhm* (Wolf-Jäckel et al., 2012), verificou-se que a carga destes microorganismos no sangue se correlacionava com a carga detectada nos tecidos, apresentando maiores valores no início da infecção e uma tendência para diminuir no decorrer da mesma. No início da infecção, estes microorganismos foram também encontrados num maior número de tecidos, diminuindo com o passar do tempo. À semelhança do que se verificou para os animais infectados por *Mhf* (Tasker et al., 2009b), também neste estudo não foi documentado o sequestro de *CMhm* nos tecidos, uma vez que as cargas aí detectadas não excederam o valor esperado, dado o fornecimento de sangue. Embora, tenha sido detectado um maior número de cópias de *CMhm* no baço, pulmão, fígado, coração e aorta (quando comparadas as cargas de diferentes tecidos individualmente), esta distribuição foi, meramente associada com a possível alteração do fluxo de sangue no momento da necrópsia e/ou com o excesso de barbitúricos (Wolf-Jäckel et al., 2012).

A capacidade do *CMhm* em despoletar anemia tem vindo a ser investigada, tendo sido encontradas prevalências de infecção em gatos anémicos, similares ou inferiores às aquelas observadas em animais aparentemente saudáveis, sugerindo que esta espécie por si só não esteja na origem da anemia (Jensen et al., 2001; Sykes et al., 2007b; Tasker et al., 2003b; Willi et al., 2006c). Outro estudo, efectuado em gatos esplenectomizados e co-infectados com *Bartonella henselae*, veio também corroborar a ausência de associação entre a infecção despoletada e a ocorrência de anemia (Sykes et al., 2007a). No entanto, outros trabalhos reportam a evidência desta relação, por se constatar uma elevada presença deste microorganismo nos animais com quadros clínicos suspeitos de hemoplasmoses (Sykes et al., 2008a), e/ou por ausência de detecção de outro factor responsável pelo estabelecimento da anemia (Hornok et al., 2008; Reynolds & Lappin, 2007). Não pode, no entanto, ser esquecido que o desenvolvimento da anemia hemolítica imunomediada pode apresentar outras causas subjacentes.

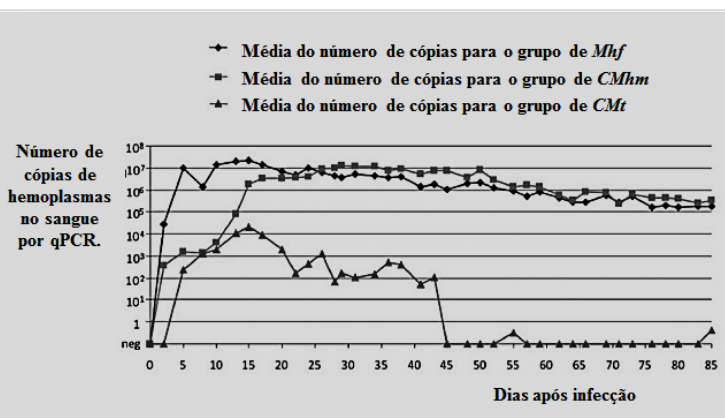
Anemia marcada pode ocorrer em gatos que apresentam doenças concomitantes (de Lorimier & Messick, 2004), ou co-infecção com retrovírus, particularmente com o FeLV. Estes animais possuem maior susceptibilidade em desenvolver doença mieloproliferativa do que aqueles apenas infectados por FeLV (George et al., 2002). Os mecanismos propostos para a

explicação deste facto incluem a imunossupressão induzida pela infecção por hemoplasmas, a ocorrência de hiperplasia eritróide e a estimulação do sistema imunitário.

A presença de *CMt* foi inicialmente descoberta num gato com anemia hemolítica grave (Willi et al., 2005). Esta associação foi novamente encontrada em gatos infectados experimentalmente, sobretudo naqueles imunodeprimidos pela administração de glucocorticóides. No entanto, noutra estudo efectuado, o mesmo isolado originou anemia ligeira em três gatos igualmente tratados com glucocorticóides, tendo-se verificado que o grau de anemia era proporcional à carga do microorganismo inoculado (Museux et al., 2009). Segundo Tasker et al., (2009), a inoculação de *CMt* origina uma ligeira descida dos parâmetros hematológicos, sem contudo se desenvolver anemia (Tasker et al., 2009a). Os estudos que envolvem animais infectados por via natural, documentam apenas uma diminuição significativa do hematócrito nos gatos co-infectados com *Mhf* ou *CMhm*, contrariamente aos animais apenas infectados com *CMt* (Willi et al., 2006b).

O pico da bacteriémia surge por volta das 2 semanas após infecção, à semelhança do que acontece com o *Mhf*; no entanto, não foram detectadas variações cíclicas no número de cópias deste microorganismo (Tasker, 2010). Contrariamente ao que se verifica nas restantes espécies, pode observar-se uma descida abrupta do número de cópias de *CMt* por volta do dia 40 após inoculação e resultados negativos por volta do dia 45 (Tasker et al., 2009a), tendo sido, no geral, reportadas cargas mais baixas deste microorganismo comparativamente com as restantes espécies (Museux et al., 2009; Tasker et al., 2009a; Willi et al., 2005; Willi et al., 2006b; Willi et al., 2006c). (Figura 14)

Figura 14 - Média representativa do número de cópias de hemoplasmas ao longo do tempo para três grupos de gatos infectados com as três espécies (Adaptado de Tasker, 2010).



Com base em alguns estudos, constatou-se ainda a existência de uma correlação inversa entre o pico de carga dos microorganismos no sangue e a gravidade da anemia (Museux et al., 2009), assim como entre o nível de carga do microorganismo nos tecidos e o tempo decorrido desde a infecção, tal acontece com o *CMhm* (Novacco et al., 2011; Wolf-Jäckel et al., 2012).

Apesar de ter sido reportada a eliminação espontânea da bacteriemia em gatos infectados experimentalmente, em alguns casos sem recurso a tratamento (Museux et al., 2009; Tasker et al., 2009a; Willi et al., 2006c), esta espécie tem sido comumente identificada por PCR ou serologia em infecções crônicas, meses após a recuperação da bacteriemia (Novacco et al., 2011).

A patogenicidade deste microorganismo parece ser baixa no geral (Sykes et al., 2008a; Tasker et al., 2009a; Willi et al., 2006c), sendo detectado predominantemente em animais com outro(s) processo(s) de doença associado(s), tais como neoplasias e infecção por retrovírus, especialmente por FIV (Willi et al., 2006c). Com base num estudo recente, os gatos infectados cronicamente com esta espécie não parecem ser fonte de infecção para outros gatos, tendo em conta a ausência de reactivação da infecção após indução de imunossupressão (Novacco et al., 2011). Esta espécie tem sido também comumente associada com a presença de outras espécies de hemoplasmas e parecem ser estes cofactores, por debilidade do sistema imunitário, os responsáveis pelo desenrolar da doença clínica, tal como acontece nas infecções provocadas por CMhm (Sykes, 2010b; Tasker, 2010).

A significância da co-infecção não está completamente esclarecida, tendo sido sugerido que a infecção provocada por CMhm poderia funcionar como protecção contra uma posterior infecção por Mhf (Foley & Pedersen, 2001). No entanto, alguns autores referem que esta protecção não ocorre, tendo em conta a maior gravidade de sinais clínicos manifestada em infecções combinadas (Westfall et al., 2001) e a intensificação da resposta imunitária quando o animal é sujeito a uma segunda infecção com outra estirpe (Berent, Messick, Cooper, & Cusick, 2000).

A reinfeção com a mesma espécie de hemoplasma pode, no entanto, conferir protecção imunitária, uma vez que os animais infectados por CMt, que recuperaram da fase aguda sem recurso a tratamento, apresentaram protecção contra uma segunda bacteriemia após reinfeção com a mesma estirpe (Novacco et al., 2012b), corroborando os resultados preliminares de um estudo anterior (Novacco et al., 2012a). Não foram detectados microorganismos nos tecidos destes animais, contrariamente aos gatos do grupo de controlo que se tornaram positivos por PCR, tanto no sangue como nos tecidos testados. Verificou-se ainda uma diminuição transitória do nível de anticorpos nos gatos reinoculados com a estirpe, factor que pode ser explicado pela ligação dos anticorpos específicos previamente formados aos antígenos reinoculados. Neste estudo, foi sugerido que a presença destes anticorpos específicos pode não ser a única responsável na protecção contra a reinfeção, de acordo com a persistência de resultados serológicos negativos num gato, que no entanto, manteve protecção após a segunda inoculação do microorganismo (Novacco et al., 2012b). A resposta celular foi também

avaliada, tendo sido detectadas alterações na expressão de citocinas em ambos os grupos, com aumento do factor de necrose tumoral α (TNF α) nos gatos do grupo de controlo, e um aumento precoce de interleucina-4 no grupo de gatos reinoculados. Pensa-se que a protecção contra a reinfeção foi causada por uma resposta Th2 marcada e precoce, enquanto nos gatos do grupo de controlo se verificou uma resposta Th1 prévia, seguida de uma resposta Th2 como forma de inibir a carga bacteriana. Detectou-se ainda eosinofilia constante no grupo de animais reinoculados, facto já documentado em infecções por hemoplasmas felinos (Braddock, Tasker, & Malik, 2004; Dowers, Tasker, Radecki, & Lappin, 2009), e que aparece agora explicado pela associação com a resposta Th2. Foi reportado ainda um maior número de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺ e CD5⁺MHCII⁺ nos animais reinoculados, com especial relevo para o aumento das células T CD4⁺CD25⁺ que parecem suprimir a resposta imunitária a agentes patogénicos (Vahlenkamp, Tompkins & Tompkins, 2005)⁵, contribuindo para a permanência de um estadio de portador. Pelo contrário, nos animais do grupo de controlo, a diminuição do número destas células durante o pico de bacteriémia resultou na melhoria do combate à infecção. Segundo os autores, a presença de linfocitose nos gatos reinoculados deveu-se presumivelmente à estimulação antigénica crónica, identificada num estudo, onde os gatos infectados cronicamente por *CMt* mostraram estimulação antigénica significativa, com aumentos da γ -globulina (Baumann et al., 2013).

Os animais que recuperam da doença aguda, com ou sem recurso a tratamento, normalmente permanecem portadores crónicos durante anos, sem qualquer manifestação clínica da doença (Sykes, 2010b; Tasker, 2010). Diversos mecanismos têm sido apontados para a perpetuação desta situação, como a detecção de microorganismos vivos no interior de vacúolos fagocíticos dos macrófagos esplénicos e pulmonares (Messick & Harvey, 2011); a inclusão destes microorganismos no interior dos eritrócitos (Groebel, Hoelzle, Wittenbrink, Ziegler, & Hoelzle, 2009); ou a recente descoberta do sequestro de *CMt* nos tecidos (Novacco et al., 2011; Novacco et al., 2013), que poderia incitar a estimulação persistente do sistema imunitário do animal e a manutenção do estado de portador crónico. Contudo, esta situação não foi verificada para o *Mhf* (Berent et al., 2000; Tasker et al., 2009b) nem para o *CMhm* (Wolf-Jäckel et al., 2012).

A imunidade humoral e celular recentemente estudada na protecção contra a reinfeção com a mesma espécie de hemoplasmas (Novacco et al., 2012b), parece controlar a replicação dos microorganismos e possibilitar a manutenção de um estado de equilíbrio entre estes e o animal portador.

⁵Citado por: Novacco et al., 2012b.

A capacidade de evasão ao sistema imunitário tem sido reportada pela de seropositividade e positividade ao PCR no sangue e/ou tecidos, consoante a espécie (Novacco et al., 2011), durante muitos meses/anos após a recuperação da infecção aguda. No *Mhf* esta capacidade foi recentemente associada com a diversidade antigénica manifestada por estes microorganismos (Santos et al., 2011).

A identificação de 5 antígenos envolvidos na infecção provocada por um isolado de *Mhf* foi realizada em 1999, com demonstração da resposta imunitária à infecção por volta do dia 14 após inoculação e persistência durante todo o curso da infecção (Alleman et al., 1999). O conhecimento destes antígenos conduziu ao desenvolvimento de testes imunoenzimáticos (Wolf-Jäckel et al., 2010), onde se utiliza como antígeno uma proteína recombinante do *Mhf*, numa prova de ELISA. A proteína seleccionada é uma versão da DnaK de *Mhf*, uma proteína de choque térmico análoga ao antígeno HspA1 de *M. suis* (Hoelzle et al., 2007)⁶. A utilização deste teste para detecção de anticorpos específicos após infecção experimental de *Mhf*, originou uma resposta humoral entre o dia 8 e o dia 14 após inoculação, constatando-se posteriormente positividade por PCR no sangue (Wolf-Jäckel et al., 2010). Encontrou-se ainda uma correlação entre as cargas do microorganismo no sangue e os níveis de anticorpos, assegurando a possibilidade de utilização deste antígeno recombinante em ensaios serológicos, quer para quantificação do nível de anticorpos quer para confirmação da seroconversão dos animais infectados. Em estudos recentes envolvendo animais co-infectados com *CMhm* e FeLV, as seroconversões foram detectadas entre as 3 e as 13 semanas após inoculação, encontrando-se igualmente uma correlação entre os níveis de anticorpos detectados no sangue com as cargas do microorganismo (Wolf-Jäckel et al., 2012). No entanto, num estudo realizado com *CMt*, o pico de anticorpos ocorreu apenas após o pico das cargas bacterianas no sangue (Novacco et al., 2012a). Neste estudo, verificou-se seroconversão após inoculação subcutânea, intraperitoneal ou endovenosa do microorganismo, com alguns animais a demonstrar presença de anticorpos logo após exposição a saliva contaminada, como relatado anteriormente por Museux et al., (2009). A existência destas seroconversões prematuras foi caracterizada pela detecção de baixos níveis de anticorpos na ausência de detecção por PCR, tendo sido sugerido que a replicação de *CMt* se manteve abaixo do limite de detecção do PCR ou que ocorreu noutros locais, como se supôs anteriormente (Novacco et al., 2012a). A permanência de anticorpos foi reportada por mais de 2 anos após infecção e por mais de 1,5 anos após obtenção de resultados negativos por PCR (Wolf-Jäckel et al., 2010), similarmente ao que tem sido reportado por outros estudos envolvendo outras espécies (Museux et al., 2009).

⁶Citado por: Wolf-Jäckel et al., 2010.

Estes dados sugerem a existência de estimulação antigénica activa na fase crónica da infecção, possivelmente por sequestro do antígeno nos tecidos (Wolf-Jäckel et al., 2010). Esta ideia é defendida por alguns autores, de acordo com a detecção de um maior número de cópias do microorganismo nos tecidos, em relação ao número esperado apenas com base no fornecimento de sangue (Tasker, personal communication)⁷; no entanto, não foi ainda confirmada para todas as espécies de hemoplasmas felinos.

Tem sido também sugerida a ocorrência de reactivação da infecção por diversos factores, como gravidez, neoplasia, doenças concomitantes e/ou situações de stress (Berent, Messick, & Cooper, 1998; Sykes, 2010b). No entanto, as tentativas em reproduzir experimentalmente a doença através da administração de glucocorticóides ou ciclofosfamida, esplenectomia e criação de abscessos, têm sido francamente desencorajadoras (Harvey & Gaskin, 1978)⁸. Um exemplo disso foi a ausência de reactivação significativa da infecção crónica provocada por *CMt* (Novacco et al., 2011), mesmo após indução da imunossupressão. Segundo os autores, esta falha pode ter-se devido à altura em que foi efectuada a reactivação, que poderia ter sido bem sucedida se realizada na altura em que os gatos ainda apresentavam positividade ao PCR nos tecidos. Alternativamente, pode considerar-se a diferença na cinética da infecção provocada por *Mhf* e *CMt*, com este último a não causar reactivação significativa da infecção, mesmo após episódios de imunossupressão.

O efeito imunossupressor da esplenectomia é inconstante no gato, contrariamente ao que se verifica nas infecções provocadas por hemoplasmas noutros animais, onde a esplenectomia é necessária para que ocorra manifestação da doença (Sykes, 2010b). Este órgão apresenta uma enorme importância na eliminação dos antígenos circulantes no sangue e na elaboração de respostas imunes específicas, tendo sido reportado um aumento do número de cópias de *Mhf* nos tecidos esplénicos e pulmonares relativamente aos níveis detectados no sangue (Tasker et al., 2009b). Em estudos experimentais, a esplenectomia foi inicialmente associada com um aumento do tempo de eliminação de *Mhf*, originando bacteriémias mais duradouras (Messick & Harvey, 2011). No entanto, apesar de ter sido documentada a recorrência de anemia e bacteriemia (Harvey & Gaskin, 1978)⁸, a maioria dos autores reporta apenas um aumento transitório do número de microorganismos visíveis nos esfregaços sanguíneos, sem alteração significativa dos valores do hematócrito (Alleman et al., 1999), independentemente da esplenectomia se ter realizado no período que antecede a infecção ou mesmo após a fase de recuperação da doença (Messick & Harvey, 2011). A infecção por *CMhm* parece não sofrer alterações com a realização da esplenectomia (Sykes et al., 2007a).

⁷Citado por: Wolf-Jäckel et al., 2010.

⁸Citado por: Sykes, 2010b.

A condição de portador crónico depende da interacção entre o hospedeiro e o microorganismo, tornando imprevisíveis quaisquer prognósticos sobre o desenrolar da infecção e do estado de permanência do microorganismo nos indivíduos.

2.7 Sinais clínicos

Os sinais clínicos manifestados pelos animais variam consoante o tipo de infecção despoletada, que pode estar dependente de factores intrínsecos ao microorganismo, como também das características individuais do hospedeiro.

Alguns dos sinais clínicos comumente encontrados numa infecção provocada por *Mhf* correspondem a sinais inespecíficos de doença, como apatia, desidratação, anorexia e consequente diminuição de peso. A anemia, por sua vez, é mais específica deste tipo de infecção, sobretudo quando provocada por *Mhf*, ocorrendo normalmente na altura em que a replicação do hemoplasma é máxima (Foley et al., 1998; Tasker et al., 2003c; Tasker et al., 2009a; Tasker et al., 2009b). Esta afecção manifesta-se por letargia, palidez das mucosas, taquipneia, taquicardia, desenvolvimento de sopros cardíacos, e ocasionalmente síncope ou sinais neurológicos, se esta ocorrer de forma aguda e grave (Foley et al., 1998; Harrus et al., 2002; Sykes, 2010a).

Pode ainda ocorrer alteração no comportamento do animal, que passa a adoptar hábitos peculiares como o lambar das paredes ou a ingestão de lixo do *cat litter* (Sykes, 2010a). Outras alterações físicas podem incluir a esplenomegália, por hematopoiese extramedular e destruição extravascular dos eritrócitos, e a icterícia, que ocorre apenas em casos de hemólise aguda e grave (Messick & Harvey, 2011; Tasker, 2010). A temperatura normalmente encontra-se dentro dos valores de referência; no entanto alguns gatos podem estar febris intermitentemente, principalmente em infecções agudas. A hipotermia ocorre por vezes nos animais moribundos (Messick & Harvey, 2011; Sykes, 2010b).

Na infecção provocada por *CMhm* normalmente não ocorre manifestação de sinais clínicos, (Foley et al., 1998) podendo por vezes surgir febre moderada (Westfall et al., 2001) e/ou anemia regenerativa ligeira (Reynolds & Lappin, 2007; Tasker et al., 2003b). A detecção frequente desta espécie em animais doentes dificulta a associação da infecção com a presença de sinais clínicos, que muitas vezes são comuns a outros processos mórbidos subjacentes (Tasker et al., 2003b).

O *CMt* pode despoletar anemias hemolíticas moderadas a graves nos gatos infectados, sobretudo na presença de retrovírus ou outros factores que induzam imunossupressão (Willi et al., 2006a).

2.8 Alterações laboratoriais

A alteração mais característica do hemograma é a presença de anemia regenerativa. Na altura em que os animais manifestam os sinais clínicos, geralmente os valores do hematócrito já se encontram abaixo de 20% e frequentemente abaixo de 10% (Messick & Harvey, 2011). No entanto, este parâmetro deve ser avaliado com precaução, uma vez que a presença de um valor elevado pode dever-se à libertação dos eritrócitos sequestrados pelo baço, sem que ocorra necessariamente reticulocitose. Pelo contrário, a presença de um valor diminuído pode explicar-se pela colheita de sangue precoce, não tendo havido tempo para o desenvolvimento de uma resposta regenerativa, ou devido a infecção concomitante por retrovírus ou outros processos mórbidos (Sykes, 2010a). Especial atenção deve ser dada aos animais infectados por *Mhf* atendendo às flutuações cíclicas do hematócrito.

A maioria dos animais apresenta uma anemia regenerativa com reticulocitose e policromasia, sendo frequentemente observadas macrocitose, hipocromia, anisocitose, eritrócitos nucleados e um aumento de corpos de Howell-Jolly em circulação durante a fase aguda de infecção. No entanto, estes parâmetros não são indicadores fidedignos de resposta regenerativa no gato, podendo aparecer isoladamente noutras afecções (Messick & Harvey, 2011; Sykes, 2010a). A presença de anisocitose marcada sem policromasia por exemplo, pode ser encontrada em doenças mieloproliferativas, reconhecidas nos gatos infectados por FeLV. A presença deste vírus em gatos infectados por hemoplasmas pode originar a instalação de uma anemia não regenerativa persistente, factor que deve ser tido em conta durante a interpretação dos resultados (Bobade et al., 1988; VanSteenhouse, Taboada, & Dorfman, 1995). Os gatos anémicos infectados por retrovírus devem ser sempre testados para infecções com hemoplasmas (Sykes, 2010b).

A contagem de leucócitos fornece um diagnóstico limitado, podendo, no entanto ser avaliado o aumento da reactividade dos monócitos (Foley et al., 1998; Harrus et al., 2002). Nos esfregaços sanguíneos pode ainda observar-se a fagocitose dos eritrócitos infectados como resultado da actuação dos anticorpos e/ou do complemento (Messick & Harvey, 2011).

A ligação dos microorganismos aos eritrócitos resulta na exposição de antigénios ocultos ou na alteração de antigénios existentes, activando a produção de anticorpos anti-eritrocitários (Peters et al., 2010). A presença destes anticorpos pode também ser detectada pela presença de auto-aglutinação que ocorre nos estadios iniciais da hemoplasmose aguda (Zulty & Kociba, 1990) e pela positividade no teste de Coombs (antiglobulina directa) a 37°C (Tasker et al., 2009a). Os resultados deste teste podem ser obtidos na semana que se segue à primeira bacteriémia e permanecem positivos durante a fase aguda da infecção (Messick & Harvey, 2011).

Os anticorpos reactivos a 4°C associados aos eritrócitos, pertencem às classes IgM e IgG (Alleman et al., 1999; Tasker et al., 2009a; Zulty & Kociba, 1990) e podem ser detectados no início da infecção. De acordo com um estudo realizado em 2009, estes anticorpos surgem entre o dia 8 e o dia 22 após inoculação de *Mhf* em gatos, e persistem por um período de 2 a 4 semanas; ao contrário dos anticorpos reactivos a 37°, pertencentes à classe IgG, que aparecem apenas entre o dia 22 e o dia 29, persistindo até às 5 semanas (Tasker et al., 2009a). A ausência dos anticorpos no início da instalação da anemia poderia reflectir a falta de sensibilidade do teste de Coombs nesta fase, contudo, a detecção dos anticorpos ocorreu apenas após a descida dos parâmetros hematológicos na maioria dos gatos. Estes dados sugerem que a produção de anticorpos ocorre em consequência da infecção por *Mhf* e/ou hemólise e não por serem estes os responsáveis pela mediação da anemia. Ao contrário do que se verifica nesta espécie, não foram detectados anticorpos reactivos a 4° C ou a 37° C nos eritrócitos infectados por *CMhm* e *CMt* (Tasker et al., 2009a).

No decorrer da infecção provocada pelo *Mhf* verifica-se ainda a diminuição do rácio mielóide/eritróide (M:E), por aumento do número dos eritrócitos e dos seus estadios imaturos, em resposta à sua destruição (Messick & Harvey, 2011).

Pode verificar-se um aumento da concentração das proteínas plasmáticas totais em alguns animais, devido a desidratação, à instituição de uma resposta de fase aguda, ou ainda pela estimulação antigénica crónica (Laberke et al., 2010; Messick & Harvey, 2011). Pode ainda observar-se uma coloração amarelada do plasma devido a hemólise, nos 2 dias que sucedem a diminuição rápida do hematócrito. No entanto, o índice ictérico e a concentração da bilirrubina plasmática não estão sempre aumentados, possivelmente porque o sequestro dos eritrócitos não resulta sempre na sua destruição (Messick & Harvey, 2011).

O perfil bioquímico pode mostrar aumentos na actividade das enzimas hepáticas, devido a hipóxia hepática secundária à anemia ou a lipidose hepática secundária à anorexia. Pode verificar-se ainda um aumento das concentrações de ureia sem que ocorra aumento das concentrações de creatinina, correspondendo à instalação de uma azotémia pré-renal, secundária à desidratação (Harrus et al., 2002; Tasker et al., 2009a).

A hipoglicémia foi também reportada em espécies de produção animal infectadas com hemoplasmas (Love, Wilson, McEwen, & Wiygul, 1977; McLaughlin et al., 1990; Zachary & Smith, 1985), embora não tenha sido detectada em gatos infectados experimentalmente, segundo os resultados de estudos mais recentes (Tasker et al., 2009a). Pode, no entanto, ser encontrada nos animais moribundos (Messick & Harvey, 2011).

A infecção por *Mhf* e *CMhm* foi associada com uma resposta de fase aguda em gatos co-infectados com FIV (Korman et al., 2012), tendo-se verificado o aumento da concentração de

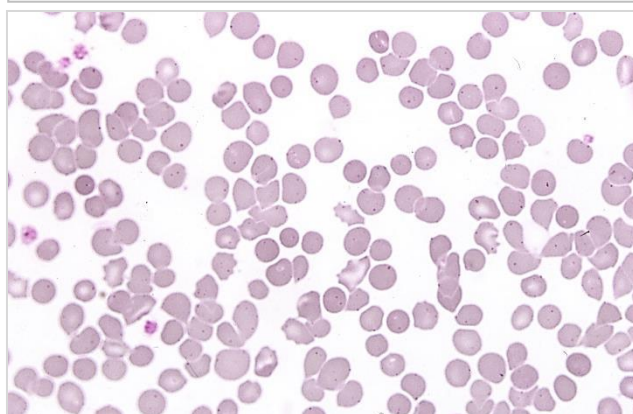
amilóide sérica A (SAA) nos animais infectados com ambas as espécies, embora com maior relevo nos animais infectados por *Mhf*. Possivelmente, devido à maior patogenicidade deste microorganismo, verificou-se ainda o aumento da concentração de α -1-glicoproteína ácida (AGP) nestes animais. Embora sejam apenas indicadores inespecíficos de inflamação e infecção, a medição da concentração destas proteínas pode facilitar a detecção da fase de infecção, uma vez que a concentração elevada de SSA foi encontrada apenas na fase aguda da infecção por hemoplasmas (< 44 dias após infecção). Constatou-se também que os animais co-infectados com FIV e *CMhm* tinham concentrações mais baixas de AGP e que os animais co-infectados por FIV e *Mhf* tinham maiores concentrações de haptoglobina (Hp) do que os gatos não infectados por FIV, sugerindo que a infecção crónica de FIV possa alterar a resposta de fase aguda, consoante a espécie de hemoplasma.

2.9 Diagnóstico

2.9.1 Diagnóstico citológico

A detecção de micoplasmas hemotrópicos tem sido feita ao longo dos anos através da avaliação citológica de esfregaços sanguíneos (Tasker, 2010). Nesta técnica, os hemoplasmas aparecem sob a forma de anel, haste/bastão ou pequenos cocos, com cerca de 0.3 a 0.8 μ m de diâmetro, geralmente aderentes aos eritrócitos. (Figura 15) Estes microorganismos podem ainda ser encontrados sozinhos, em pares ou, menos frequentemente aglomerados sob a forma de cadeias (Messick & Harvey, 2011; Tasker, 2010). Esta técnica pode ser realizada após coloração com Romanowsky, Giemsa ou Diff-Quik, embora possa ser difícil reconhecer baixos

Figura 15 – Visualização de hemoplasmas num esfregaço sanguíneo de um gato infectado. Fotografia cedida pelo laboratório de análises clínicas do EMV - III



números de microorganismos com a utilização deste último corante. Não devem ser também utilizados corantes de reticulócitos ou o corante azul-de-metileno novo, tendo em conta a dificuldade em diferenciar os hemoplasmas do material ribossómico precipitado (Messick & Harvey, 2011). Estas técnicas geralmente apresentam baixos valores de sensibilidade e especificidade que limitam a sua utilização, (Tasker et al., 2003c; Tasker, 2010) tendo sido reportados valores de apenas 0-37.5% para a sensibilidade (Bauer, Balzer, Thure, & Moritz,

2008; Tasker et al., 2003c; Westfall et al., 2001), e cerca de 84% a 98% para a especificidade (Bauer et al., 2008; Tasker et al., 2003b).

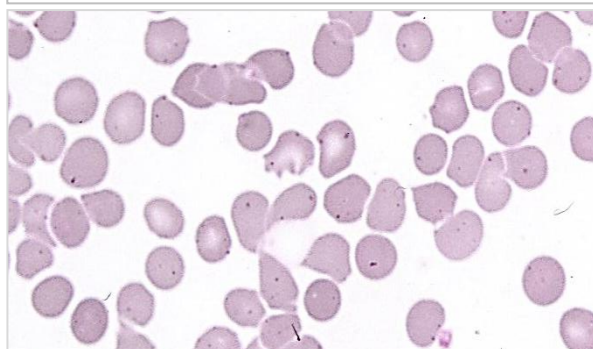
Quando são observados hemoplasmas nos esfregaços sanguíneos, normalmente correspondem a *Mhf*, embora a citologia não permita diferenciar as espécies (Sykes et al., 2008a). Este microorganismo com cerca de 0.6µm é observado em gatos que apresentam anemia hemolítica aguda; no entanto, devido às flutuações de carga referidas, pode não ser visualizado em mais de metade do tempo da duração da infecção (Sykes, 2010a).

O *CMhm* raramente é observado nos esfregaços sanguíneos de gatos portadores de infecção crónica; no entanto, quando identificado, aparece maioritariamente sob a forma de bastão/haste ou cocos e menos frequentemente sob a forma de anel (Messick & Harvey, 2011; Sykes, 2010b). Estes microorganismos são encontrados em menor número por eritrócito, retêm menos corante e apresentam cerca de metade do tamanho (aproximadamente 0.3 µm) do *Mhf* (Foley et al., 1998; Foley & Pedersen, 2001; George et al., 2002; Westfall et al., 2001). Apesar da diferença de tamanhos, a distinção entre espécies apenas com base na sua morfologia não é credível, tornando-se premente a utilização de análises mais sensíveis para uma identificação correcta (Messick & Harvey, 2011). (Figura 16)

A caracterização morfológica de *CMt* permaneceu ausente até há bem pouco tempo, tendo em conta a detecção de níveis reduzidos de carga infectante no sangue no decorrer da infecção (Willi et al., 2011).

A avaliação citológica destes microorganismos deve ser realizada imediatamente após a colheita, uma vez que pode ocorrer a sua libertação dos eritrócitos na presença do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) utilizado como anticoagulante (Sykes, 2010a). Além disso, ocorrem comumente diagnósticos falso-positivos associados a esta técnica, particularmente quando os hemoplasmas são confundidos com ponteados basofílicos, corpos de Howell-Jolly ou precipitados de corante devido ao tempo prolongado de secagem dos esfregaços (Sykes, 2010a; Tasker, 2010). Esta técnica, quando devidamente executada e interpretada, pode ser útil em situações de infecção aguda como teste de diagnóstico imediato (Tasker, 2010); contudo, é cada vez menos utilizada devido às suas limitações, devendo ser confirmada a presença dos hemoplasmas por técnicas moleculares de diagnóstico.

Figura 16 – Ampliação da figura anterior, realçando a dificuldade em distinguir as espécies apenas com base na sua morfologia



2.9.2 Diagnóstico molecular

A detecção de hemoplasmas felinos através de PCR baseia-se na identificação e amplificação de uma região genómica específica, de forma a aumentar a probabilidade de detecção destes microorganismos nas amostras testadas (Tasker, 2010). Esta técnica pode ser realizada a partir de esfregaços sanguíneos (Sykes, Owens, Terry, Lindsay, & Pusterla, 2008b), embora seja preferida a utilização de pequenos volumes (0.1 ou 0.2 ml) de sangue total. A colheita de sangue deve ser efectuada para tubos com EDTA, preferencialmente antes da instituição de antibióticos que podem falsear os resultados obtidos (Tasker, 2010).

O diagnóstico molecular pode ser realizado por PCR convencional não quantitativo, que permite a avaliação da presença ou ausência do microorganismo no material biológico testado ou através de PCR quantitativo em tempo real, que utiliza *primers* específicos e uma sonda marcada, para detectar o DNA dos hemoplasmas enquanto a reacção está a decorrer (Sykes, 2010a; Tasker, 2010). Esta técnica pode facultar informação acerca da carga infectante, ao possibilitar a quantificação do DNA de hemoplasmas presente no sangue do animal. A avaliação destes parâmetros pode auxiliar também na determinação da gravidade da infecção, assim como na monitorização da resposta ao tratamento (Tasker, 2010).

As técnicas de PCR convencional distinguem a infecção originada por *Mhf*, *CMhm* (Berent et al., 1998; Criado-Fornelio et al., 2003; Jensen et al., 2001) e mais recentemente por *CMt* (Santos et al., 2009). No entanto, são menos específicas do que as técnicas de PCR quantitativo em tempo real (Peters et al., 2008a), que detectam e quantificam as três espécies descritas, com a utilização de sondas e *primers* apropriados para cada uma delas (Tasker et al., 2003c; Willi et al., 2005).

Os resultados positivos a hemoplasmas felinos por PCR podem manter-se por longos períodos de tempo, mesmo na ausência de visualização dos microorganismos nos esfregaços sanguíneos (Berent et al., 1998; Tasker et al., 2009a). No entanto, alguns isolados podem não ser consistentemente detectados no PCR em tempo real, especialmente nos gatos portadores assintomáticos (Berent et al., 1998; Foley et al., 1998; Jensen et al., 2001; Messick, Berent, & Cooper, 1998; Peters et al., 2008a; Tasker et al., 2003b; Tasker et al., 2003c; Tasker et al., 2009a; Westfall et al., 2001), uma vez que, especialmente nesta fase, podem estar presentes em níveis muito baixos no sangue e nos tecidos, dificultando a sua detecção. Os resultados do PCR juntamente com a avaliação da resposta humoral podem ser importantes nestas fases, assim como na presença de flutuação da carga bacteriana no sangue manifestada por alguns animais (Novacco et al., 2012a).

A infecção não deve ser descartada apenas com base nos resultados do PCR, devendo avaliar-se igualmente os sinais clínicos e alterações hematológicas do paciente, a espécie de

hemoplasma considerada e a quantidade de DNA presente no sangue (Tasker, 2010). Devem ainda ser considerados diagnósticos alternativos, como anemia hemolítica imunomediada primária, anemia hemolítica por corpos de Heinz, defeitos hereditários, existência de hemorragias gastrointestinais ocultas e outras causas infecciosas (Sykes, 2010b), para os gatos que revelam positividade a *CMhm* e *CMt*, uma vez que estas espécies normalmente não despoletam sinais de doença por si só (Tasker, 2010).

Durante a fase de tratamento os resultados são normalmente negativos; no entanto, muitos gatos voltam a apresentar positividade após o término da terapêutica (Berent et al., 1998; Braddock et al., 2004). A eliminação completa da infecção pode ser difícil mas geralmente é suficiente a demonstração consecutiva de resultados negativos por PCR (Tasker, 2010).

A utilização destas técnicas reveste-se de maior importância quando aplicada no despiste de gatos clinicamente saudáveis para admissão nos bancos de sangue e em colónias livres de patogénios específicos (Messick & Harvey, 2011), ou em estudos epidemiológicos, com caracterização da prevalência de infecção nas diferentes populações de gatos de diferentes localizações geográficas e climatéricas.

2.10 Tratamento

Cerca de um terço dos gatos não tratados, que apresentam infecções agudas não complicadas provocadas por *Mhf*, morrem como resultado de anemia grave (Messick & Harvey, 2011). No entanto, antes da instituição de qualquer tratamento, deve ser considerada a realização de alguns exames de diagnóstico, como a avaliação citológica de esfregaços sanguíneos com sangue fresco, observação de aglutinação em lâmina, hemograma completo (incluindo citologia com o corante azul de metileno novo para os corpos de Heinz), teste de Coombs, tipificação e determinação da compatibilidade do sangue, testes serológicos para detecção de FIV e FeLV, painel bioquímico e urianálise, assim como, PCR para detecção de *Mhf*, *CMhm* e *CMt*. Em alguns animais pode ser ainda considerada a execução de provas de coagulação (Sykes, 2010b).

Mais importante do que a instituição correcta de um tratamento, torna-se a adequação da sua necessidade, encontrando-se desaconselhado o tratamento de gatos portadores crónicos sem sinais clínicos de infecção (Sykes, 2010a), uma vez que a medicação não provoca a eliminação completa dos microorganismos (Berent et al., 1998; Dowers, Olver, Radecki, & Lappin, 2002; Foley et al., 1998; Ishak et al., 2008; Tasker et al., 2004b; Tasker et al., 2006a; Tasker et al., 2006b).

O tratamento é apenas dirigido aos gatos com presença de sinais clínicos e alterações laboratoriais e/ou em situações de infecção ou doença prévia concomitante, que possa ser

exacerbada pela presença destes microorganismos (Tasker, 2010). Se necessário, o tratamento pode ser iniciado antes da chegada dos resultados do PCR (Sykes, 2010a; Tasker, 2010).

2.10.1 Antibióticos

A utilização de tetraciclina e fluoroquinolonas tem-se mostrado efectiva na redução da carga infectante no sangue, assim como na melhoria dos sinais clínicos e alterações hematológicas associadas com a infecção por hemoplasmas. A pradofloxacina, pertencente ao grupo das fluoroquinolonas, parece causar uma eliminação dos microorganismos mais duradoura a longo prazo, quando comparada com a doxiciclina (Dowers et al., 2009).

Dentro do grupo das tetraciclina pode recorrer-se à utilização da oxitetraciclina na dosagem de 22 mg/kg q8h PO, (Tasker & Lappin, 2002) ou à administração da doxiciclina na dosagem de 10 mg/kg/d, PO. Como forma de aumentar a probabilidade de eliminação da infecção, estes fármacos são utilizados em tratamentos prolongados, com cerca de duas a oito semanas de duração (Tasker et al., 2004b). A doxiciclina tem sido amplamente utilizada no tratamento da hemoplasmose felina, com eficácia comprovada para as três espécies consideradas (Dowers et al., 2002; Dowers et al., 2009; Novacco et al., 2012a; Tasker et al., 2004b). A sua administração tem sido associada à ocorrência de vômito em alguns animais, que parece diminuir quando utilizada na mesma dose, repartida por duas administrações diárias (Tasker, 2010). Dentro dos efeitos secundários reportados, salienta-se ainda a ocorrência de febre e de doença gastrointestinal, sendo que esta última se encontra associada com a acidez que algumas formulações apresentam, potenciando o desenvolvimento de esofagites (Tasker, 2010). Tem sido recomendada a sua administração preferencialmente sob a forma de suspensão, seguida de alguns mililitros de água (German et al., 2005; McGrotty & Knottenbelt, 2002; Messick & Harvey, 2011). Podem ainda ser utilizadas formulações que causem menor ocorrência de efeitos secundários; no entanto, a sua utilização em gatos é apenas autorizada na Austrália, Nova Zelândia e África do sul (Tasker, 2010).

O tratamento com fluorquinolonas tem sido utilizado alternativamente em gatos que não toleram tetraciclina (Messick & Harvey, 2011). A administração de enrofloxacin pode ser eficaz numa dosagem de 5 mg/kg q24h PO durante duas semanas; no entanto, a sua utilização em dosagens elevadas deve ser evitada por apresentar acção degenerativa sobre a retina e propensão para cegueira aguda em gatos (Dowers et al., 2002; Tasker et al., 2004b). A eficácia da marbofloxacina na dosagem de 2mg/kg q24h PO tem sido igualmente documentada, embora apresente um efeito menos marcado na diminuição do número de cópias do *CMhm* (Tasker et al., 2006a; Tasker et al., 2006b). Foi também comprovada a sua segurança em dosagens mais elevadas (2.75 mg/kg q24h PO), nos animais infectados por *Mhf*,

tendo estes exibido uma melhoria considerável nos parâmetros clínicos avaliados, (Ishak et al., 2008) sem evidência de quaisquer lesões oculares associadas com o tratamento. A eficácia da pradofloxacin foi igualmente confirmada, com a visualização do decréscimo do número de cópias de *Mhf* no sangue, melhoria dos sinais clínicos e das alterações hematológicas, tanto na dosagem de 5 mg/kg q24h PO como na dosagem de 10 mg/kg q24h PO (Dowers et al., 2009).

Pensa-se que a disparidade das respostas ao tratamento varie consoante a escolha do antibiótico, as diferentes vias de administração, a espécie infectante e/ou os diferentes isolados (Tasker, 2010). Alguns estudos reportam a ineficácia da doxiciclina ou das fluoroquinolonas nas infecções provocadas por *CMhm*, com persistência de resultados positivos nos testes de PCR ainda durante o período de tratamento (Sykes et al., 2007a; Tasker et al., 2006a). O aparecimento de resistência aos antibióticos pode também ser responsável pela discrepância das respostas observadas, tendo sido reportada como causa possível, a inclusão intra-eritrocitária do *M. suis* (Groebel et al., 2009). No entanto, recentemente foi identificado um gene envolvido no mecanismo de resistência aos antibióticos, através da produção de uma metilase que altera o local de ligação do ribossoma ao fármaco (Santos et al., 2011).

Nos casos refractários ao tratamento pode ser considerada a instituição de uma terapia dupla, efectuada tipicamente com doxiciclina e marbofloxacin (Tasker, 2010).

2.10.2 Corticosteróides

A utilização de corticosteróides como coadjuvantes no tratamento da hemoplasmosose foi sugerida inicialmente, com base na origem imunomediada da anemia despoletada (Tasker, 2010). Contudo, o papel destes fármacos não está ainda completamente compreendido, uma vez que muitos animais respondem positivamente aos tratamentos instituídos unicamente com antibiótico (Tasker et al., 2009a). Verificou-se que a administração de corticosteróides em doses imunossupressoras, numa tentativa de suprimir os danos eritrocitários imunomediados pode, no entanto, causar uma reactivação da infecção latente (Sykes, 2010a), ou complicar uma posterior infecção, por debilidade do sistema imunitário (Willi et al., 2005). De acordo com um estudo recente, a administração de metilprednisolona foi associada com o aumento dos níveis de anticorpos, assumindo o autor que a sua produção foi estimulada pela alta carga bacteriana desenvolvida após a administração de glucocorticóides (Novacco et al., 2012a). O tratamento é apenas recomendado aos animais que não revelam melhorias apesar da administração de um antibiótico apropriado, aos animais com anemia hemolítica grave, de forma a inibir a eritrofagocitose (Geffen, 2012), ou àqueles em que se pensa que a infecção

por hemoplasmas não é suficiente para causar a doença, e em que não se conhecem outras causas (Sykes, 2010b; Tasker, 2010).

2.10.3 Outros fármacos

Embora se tenha verificado a eficácia da utilização do dipropionato de imidocarb em alguns casos, Lappin et al (2002), veio refutar o efeito benéfico da sua utilização na melhoria dos sinais clínicos e valores hematológicos dos gatos infectados por *Mhf* (Lappin, Brewer, & Radecki, 2002). No entanto, de acordo com as melhorias clínicas evidenciadas por alguns, pode sempre considerar-se a sua utilização nos casos crónicos refractários ao tratamento com tetraciclina e/ou fluorquinolonas (Tasker, 2010). Considera-se segura a administração de 5 mg/kg por via intramuscular a cada duas semanas num total de 2 a 4 injeções (Tasker, 2010).

2.10.4 Terapêutica de suporte

O tratamento de suporte normalmente é dirigido ao animal que surge com sinais clínicos de hemoplasmoses (Tasker, 2010). Estes animais encontram-se frequentemente desidratados, factor que pode mascarar o grau de anemia e que deve ser corrigido de imediato com recurso a fluidoterapia, antes da reavaliação do hematócrito (Tasker, 2010). É igualmente importante encorajar os animais debilitados a comer, embora se verifique um aumento gradual do apetite e a melhoria do seu estado geral após a instituição de um tratamento apropriado (Tasker, 2010). Recomenda-se a administração de fluidos glucosados nos animais moribundos (Messick & Harvey, 2011).

Embora normalmente os gatos tolerem bem a anemia, pode ser necessário recorrer a transfusões sanguíneas com concentrado de eritrócitos ou sangue total, sobretudo quando esta ocorre de forma abrupta, sem que haja tempo para que o organismo se adapte, ou quando se manifesta com gravidade ($Ht < 12\%$), colocando em risco a vida do animal (Sykes, 2010b). Para a realização da transfusão sanguínea no gato deve ser efectuada previamente a tipificação do sangue e a avaliação da compatibilidade entre o dador e o receptor.

Pode também ser considerada a suplementação do tratamento com um composto oxigenado, responsável pelo transporte do oxigénio aos seus destinos (p.e. Oxiglobina) caso não se encontre um dador de sangue ou produtos sanguíneos disponíveis (Tasker, 2010). Deve, no entanto, ser ponderado o seu emprego em gatos com doença cardíaca, renal ou respiratória, devido ao elevado efeito colóide. Normalmente é utilizado na dosagem de 5-10 ml/kg em gatos, administrados a uma taxa de 0.5-2 ml/kg/h por via intravenosa (Tasker, 2010).

2.10.5 Monitorização da resposta ao tratamento

A monitorização da resposta ao tratamento deve basear-se na avaliação de um conjunto de parâmetros e não somente na diminuição do número de hemoplasmas, uma vez que o tratamento pode não resultar na eliminação completa do microorganismo, mas promover a sua diminuição e reverter a sintomatologia. Pelo contrário, a detecção de um elevado número de microorganismos nesta fase aponta para a ineficácia do tratamento, e consequentemente para a alteração da sua abordagem (Tasker, 2010).

A primeira monitorização deve ser efectuada uma a duas semanas após a instituição do antibiótico, e no caso de ser observado um decréscimo da carga infectante, o tratamento deve ser continuado até às oito semanas, com apresentação de resultados negativos mesmo após a sua interrupção (Tasker, 2010).

Após a recuperação da doença, os animais infectados por *Mhf*, normalmente tornam-se portadores do hemoplasma, no entanto, a recaída clínica parece improvável após estabilização do quadro clínico (Berent et al., 1998; George et al., 2002). Outros autores referem, no entanto, que é possível ocorrer recorrência da doença nos animais que permanecem positivos a hemoplasmas por PCR, sobretudo, quando na presença de outras patologias (Tasker, 2010).

2.11 Informação publicada em humanos - Implicações na saúde pública

Ao longo dos anos tem sido ocasionalmente documentada a presença de microorganismos similares a hemoplasmas em humanos (Messick & Harvey, 2011), através da avaliação citológica de esfregaços sanguíneos. A presença destes agentes foi identificada em pacientes anémicos, imunocomprometidos pelo Síndrome da imunodeficiência humana adquirida e Lúpus sistémico eritematoso (Archer, Coleman, Cole, Duma, & Johnston, 1979; Duarte et al., 1992; Kallick, Levin, Reddi, & Landau, 1972; Puntaric et al., 1986). No entanto, o meio de diagnóstico não permitia a correcta identificação dos microorganismos, tendo-se verificado posteriormente a ausência de amplificação específica, a partir do DNA extraído de amostras utilizadas em estudos anteriores (Messick & Harvey, 2011; Tasker et al., 2010).

A detecção destes microorganismos em humanos através de técnicas moleculares de diagnóstico foi primeiramente documentada no Brasil, onde se conseguiu identificar a presença de *Mhf* e *Bartonella henselae*, num indivíduo imunocomprometido com o Síndrome da imunodeficiência humana adquirida (dos Santos et al., 2008). A presença de outros hemoplasmas tem sido igualmente documentada noutras partes do mundo, tendo sido detectada a presença de microorganismos semelhantes a *Mycoplasma ovis* em associação com *Bartonella henselae* numa médica veterinária do Texas (Sykes, Lindsay, Maggi, & Breitschwerdt, 2010). Foi também reportada a infecção provocada por *M. suis* num grupo de

trabalhadores de uma quinta de porcos na China, onde se tem verificado um número alarmante de infecções provocadas por diversas espécies de hemoplasmas, tanto em animais domésticos como no Homem (Hu, Yin, Shen, Kang, & Chen, 2009; Yuan et al., 2007; Yuan et al., 2009). Nestes estudos não foram reportados os sinais clínicos associados com a infecção e os dados clínicos fornecidos são escassos para associar com a presença dos microorganismos. Contudo, um estudo recente documentou a existência de uma nova estirpe de hemoplasmas em humanos, responsável por febre e anemia hemolítica, e que respondeu ao tratamento da hemoplasmosse (Steer et al., 2011).

Os estudos acima referidos vêm corroborar a presença de infecção por hemoplasmas em humanos e fomentar a necessidade de se apostar na investigação epidemiológica nesta esfera, especialmente nos indivíduos imunodeprimidos (Tasker, 2010). A detecção destes microorganismos no Homem salienta a importância do conhecimento da sua via de transmissão, que parece ocorrer até à data, pela picada de um vector transmissor de doença ou pela transmissão directa entre o Homem e o animal através de mordeduras, arranhadelas ou do manuseamento do sangue de animais infectados (Messick & Harvey, 2011). Assim, torna-se crucial a implementação de estratégias de prevenção como forma de limitar a transmissão destes agentes entre os animais e destes para a espécie humana, quer através da eliminação de vectores artrópodes, quer através da testagem de todos os animais admitidos como dadores de sangue. Até que haja um maior conhecimento, todos os intervenientes na manipulação dos produtos sanguíneos e tecidos de gatos infectados, devem fazê-lo com precaução (Messick & Harvey, 2011; Sykes, 2010a).

3. TRABALHO EXPERIMENTAL

3.1 A sua importância

A infecção provocada por hemoplasmas felinos pode apresentar uma relevância clínica, que é na maioria das vezes difícil de determinar, uma vez que a resposta dirigida por estes animais varia consoante a espécie de hemoplasma considerada, a carga do microorganismo infectante, os diferentes isolados pertencentes a cada espécie e o próprio estatuto imunitário do animal. Tendo em conta a presença destes microorganismos em gatos saudáveis e aparentemente assintomáticos, a sua detecção molecular não implica por si só que haja doença; Com excepção do *Mhf*, estes hemoplasmas assumem especial importância em situações de imunodepressão, ou quando a estes se associam outras afecções que podem levar ao agravamento do estado clínico do animal. (Figura 17) Deste modo, torna-se importante o conhecimento da prevalência e do impacto patogénico destes agentes, sobretudo nos animais imunodeprimidos e nos dadores sanguíneos, quer para acelerar o diagnóstico e a instituição de um tratamento, como para prevenir a infecção destes animais.

Figura 17 – Fotografia de um gato com sinais de anemia. Imagem obtida de:

<http://www.vetcpdonline.co.uk/a>



Tendo em conta a ausência de informação relativa à prevalência das três espécies de micoplasmas hemotrópicos no país, julgámos ser de extrema importância a elaboração de um estudo neste sentido. No entanto, foi recentemente publicado um artigo que avalia a prevalência destes microorganismos na região do Norte e Centro de Portugal (Martinez-Diaz et al., 2013). Assim sendo, a presente dissertação permitirá avaliar as prevalências alcançadas na região de Lisboa e do Alentejo, completando a informação disponível actualmente a nível nacional.

3.2 O objectivo

O objectivo do estudo compreende não só a detecção da frequência de infecção por hemoplasmas em 250 gatos oriundos de Portugal, como também a avaliação da correlação entre a presença de infecção e a localização geográfica do animal, o ambiente onde vive, a idade, o género e o estatuto de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e/ou pelo vírus da leucemia felina (FIV/FelV).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População seleccionada

A selecção das amostras tinha como principal objectivo reunir um conjunto de populações animais díspares entre si, tanto no que diz respeito à localização geográfica e ao habitat, como a diversos parâmetros intrínsecos aos animais, tal como o género e a idade dos mesmos. A totalidade das amostras (n=250) considerada no presente estudo reflecte esse agrupamento em seis populações distintas:

- a) O primeiro grupo incluiu as amostras recolhidas no decorrer do meu estágio curricular no Hospital Escolar Veterinário da FMV, representando cerca de 51 gatos trazidos às consultas por diversos motivos.
- b) O segundo grupo reuniu as colheitas realizadas pelo Banco de Sangue Veterinário da FMV ao longo dos últimos anos, tendo-nos sido facultadas 51 amostras de sangue de gatos dadores que ocasionalmente são acompanhados ao hospital.
- c) O conjunto de amostras proveniente do rastreio virológico efectuado no gatil da Câmara Municipal de Lisboa em 2008/2009, que engloba um total de 43 gatos errantes. Este estudo foi conduzido pelo antigo aluno da FMV, Ricardo Rosado, e serviu de base à realização da sua dissertação de mestrado intitulada “Rastreio virológico de carnívoros errantes e caracterização genética viral”.
- d) O grupo de amostras representado por 21 gatos de vida livre oriundos do concelho de Moura na região do Alentejo, resultante de um rastreio virológico decorrido em 2007, com a colaboração da FMV/UL e da FCUL.
- e) O conjunto de amostras obtido de um projecto desenvolvido pelo **CIISA** em colaboração com a associação “CATUS”, que reuniu cerca de 34 gatos errantes da área da grande Lisboa.
- f) E o grupo de gatos errantes da Associação dos Amigos dos Animais Abandonados da Moita (AAAAMoita), que contou com 50 amostras. Este estudo foi desenvolvido pelas antigas alunas da FMV, Cláudia Vanessa de Barros Rodrigues e Telma Simone Oliveira Martins, tendo servido de base à realização das suas dissertações de mestrado, respectivamente intituladas de “Prevalência de retrovírus, FCV, FHV-1 e Candida spp. em felinos errantes e sua possível associação a gengivo-estomatite crónica felina (GECF) e a doença respiratória felina (DRF)” e “Detecção de Ehrlichia spp/Anaplasma spp, Rickettsia spp., Mycoplasma haemofelis e Leishmania infantum em felinos errantes e sua relação com a presença de retrovírus e com a sintomatologia manifestada”.

4.2 Critérios de inclusão das amostras

Dos 6 conjuntos amostrais seleccionados, 4 pertenciam a projectos já realizados em anos anteriores. A sua inclusão no estudo teve por base a heterogeneidade apresentada pelas populações de animais retratadas em cada conjunto de amostras, relativamente a diversos parâmetros. Como os dados fornecidos por cada grupo divergiam entre si, optámos por seleccionar a informação que se encontrava mais completa e que era comum aos 4 grupos de animais, tendo sido definidas como variáveis de estudo, o estilo de vida, a localização geográfica, o género, o intervalo de idades, o habitat e a presença ou ausência de retrovírus (FIV e/ou FeLV).

As amostras fornecidas pelo Banco de Sangue Veterinário representam o grupo de animais saudável, pelo que, nas colheitas efectuadas no Hospital Escolar da FMV optámos por seleccionar um grupo aleatório de animais, contendo gatos doentes por diversos motivos, com diferentes idades, gatos com anemia, gatos infectados por pulgas e ainda gatos saudáveis presentes nas consultas de acompanhamento.

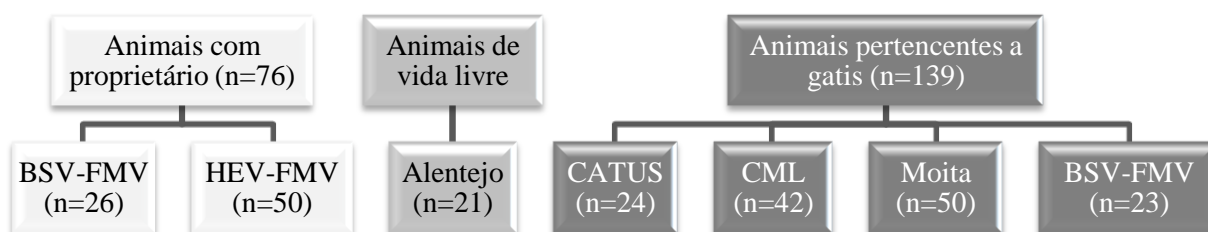
4.3 Caracterização das amostras de acordo com as variáveis em estudo

Das 250 amostras utilizadas para detectar a presença de *Mhf*, foram apenas avaliadas 247 na detecção posterior de *CMhm* e cerca de 236 na detecção de *CMt*, devido à concentração de DNA e ao volume de algumas amostras. De forma a uniformizar os resultados, os cálculos do presente estudo foram efectuados para um total de 236 animais.

4.3.1 Caracterização das amostras de acordo com o estilo de vida

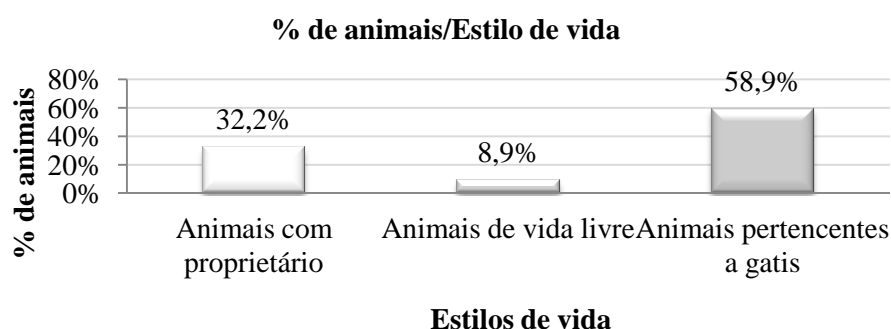
Atendendo à divergência dos grupos incluídos no estudo, e como forma de facilitar a interpretação dos resultados, as amostras foram agrupadas de acordo com o estilo de vida, em animais com proprietário, animais de vida livre e animais pertencentes a gatis. (Figura 18)

Figura 18 - Esquematização do agrupamento dos conjuntos de amostras consoante o estilo de vida.



Dos 236 animais admitidos no estudo, cerca de 32,2% (76/236) correspondem aos animais com proprietário que foram trazidos ao HEV da FMV para consultas ou doar sangue; 8,9% (21/236) representam os animais de vida livre da região do Alentejo e cerca de 58,9% (139/236) fazem parte do grande grupo de animais pertencentes a gatis. (Gráfico 2)

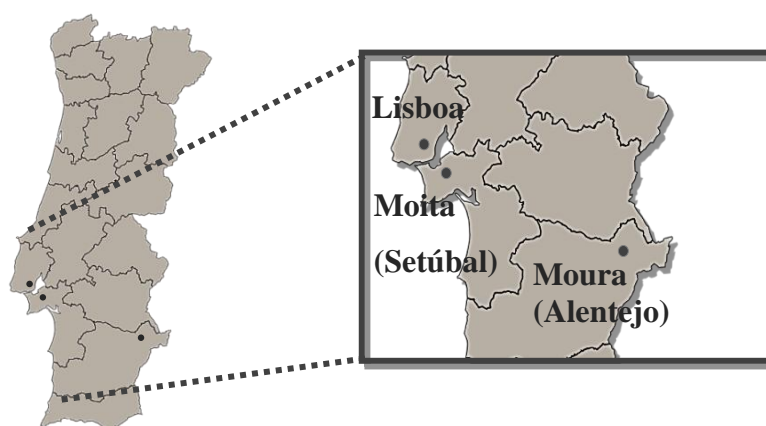
Gráfico 2 - Distribuição dos animais testados consoante os diferentes estilos de vida.



4.3.2 Caracterização das amostras por localização geográfica

Cerca de 75,8% (179/236) da população estudada localizava-se no distrito de Lisboa, 21,2% (50/236) dos animais eram originários do concelho da Moita no distrito de Setúbal e apenas 8,9% (21/236) pertenciam à cidade de Moura na região do Alentejo. (Figura 19)

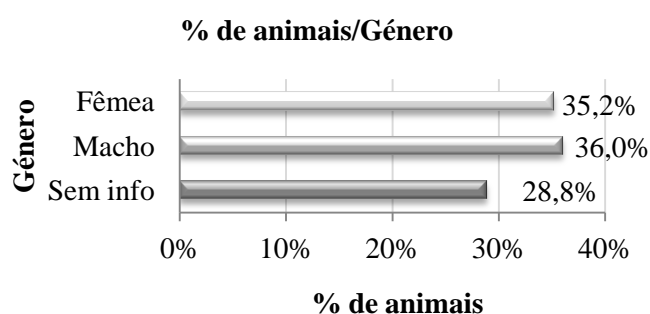
Figura 19- Localização geográfica das amostras testadas.



4.3.3 Caracterização das amostras relativamente ao género

A distribuição entre machos e fêmeas na população estudada com informação sobre o género foi semelhante, tendo sido detectada uma percentagem de 36,0% (85/236) para os machos e de 35,2% (83/236) para as fêmeas. Os restantes animais, correspondentes a 28,8% (68/236) da população, não possuíam qualquer informação relativa ao género. (Gráfico 3)

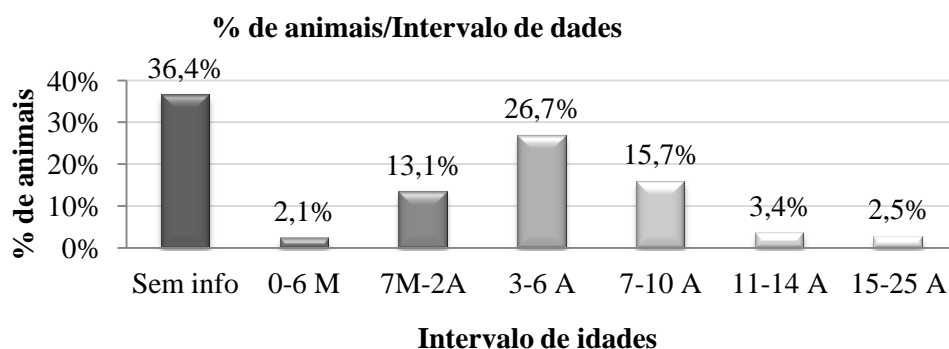
Gráfico 3 - Distribuição dos animais testados por gênero.



4.3.4 Caracterização das amostras relativamente aos intervalos de idades

Para facilitar a organização deste critério e a interpretação dos resultados, as diferentes idades foram agrupadas em intervalos, com base na informação disponibilizada pelas directrizes da American Animal Hospital Association e American Association of Feline Practitioners (AAFP-AAHA), intituladas Feline Life Stage Guidelines (Vogt et al., 2010). Da totalidade das amostras analisadas, cerca de 36,4% (86/236) dos animais não possuíam qualquer informação relativa à idade; 26,7% (63/236) encontravam-se abrangidos pelo intervalo de idades que vai dos 3 aos 6 anos; 15,7% (37/236) tinham entre 7 a 10 anos e cerca de 13,1% (31/236) encontravam-se no intervalo que abrange os 7 meses e os 2 anos de idade. Os intervalos com menor número de representantes foram os que incluíam os animais dos 0 aos 6 meses de idade, dos 11 aos 14 anos e dos 15 aos 25, com valores de 2,1% (5/236), 3,4% (8/236) e 2,5% (6/236). (Gráfico 4)

Gráfico 4 - Distribuição dos animais testados por intervalo de idades.

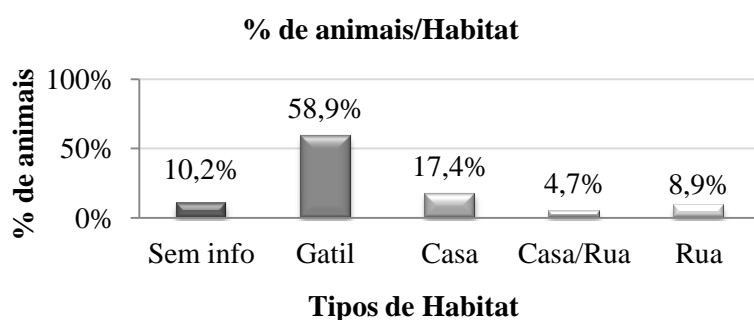


Foi também avaliada a proporção de machos e fêmeas nos diferentes intervalos de idade, tendo-se verificado um aumento do número de fêmeas no intervalo dos 7 meses aos 2 anos (19/31) e um predomínio de machos nos gatos com idades entre os 3 e os 6 anos (34/63).

4.3.5 Caracterização das amostras relativamente ao habitat

Dos seis conjuntos de amostras incluídos na população estudada, cerca de três provinham de gatis, estando representados em 58,9% (139/236) dos animais. Dos restantes grupos, cerca de 8,9% (21/236) tinham livre acesso à rua, 17,4% (41/236) eram de interior exclusivo, 4,7% (11/236) possuíam acesso limitado ao exterior e cerca de 10,2% (24/236) não apresentavam qualquer informação relativa ao habitat. (Gráfico 5)

Gráfico 5 - Distribuição dos animais testados por habitat.

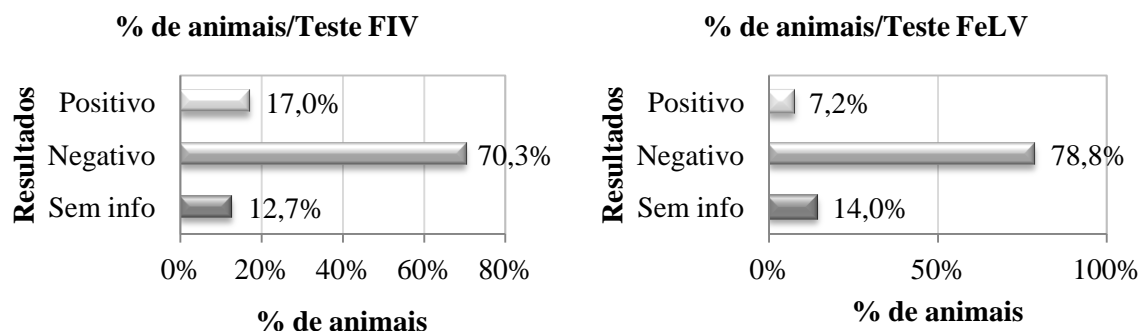


Foi também avaliada a proporção de machos e fêmeas nos diferentes habitats, tendo-se verificado um aumento do número de fêmeas (23/41) no grupo de animais de interior exclusivo, relativamente à presença de machos (18/41). Em contrapartida, o número de machos encontrado nos gatis (49/139), foi superior ao número de fêmeas (46/139), embora a diferença não tenha sido tão marcada.

4.3.6 Caracterização das amostras relativamente à presença de retrovírus

A infecção por FIV foi detectada em 17% (40/236) dos animais, a presença de FeLV foi encontrada em 7,2% (17/236) e apenas 1,3% (3/236) dos animais revelou co-infecção por ambos os vírus. A informação relativa à presença de FIV era desconhecida em 12,7% (30/236) dos animais, e cerca de 14% (33/236) não detinha informação relativa à presença de FeLV. (Gráficos 6 e 7) (*Vide* 4.3)

Gráficos 6 e 7 - Distribuição dos animais testados de acordo com o resultado dos testes para pesquisa de retrovírus.



A percentagem de animais positivos a retrovírus variou consoante a idade, tendo-se verificado a presença de animais positivos a FIV em quase todos os intervalos considerados, com excepção do grupo de animais dos 0 aos 6 meses de idade. A presença deste vírus foi notória nos animais jovens dos 7 meses aos 2 anos e dos 3 aos 6, com percentagens de 21,2% (7/31) e 21,4% (15/63), respectivamente, embora tenha sido igualmente registado em 16,7% (1/6) dos gatos com idades mais avançadas, dos 15 aos 25 anos. Em contrapartida, os animais positivos a FeLV foram detectados com maior prevalência no intervalo que abrange os 7 meses e os 2 anos, com percentagens de 15,2% (5/31), não tendo sido detectada positividade nos animais mais velhos, dos 11 aos 25 anos.

A presença de infecção por retrovírus foi maioritariamente detectada nos animais pertencentes a gatis e naqueles que possuíam acesso esporádico à rua, tendo-se verificado um aumento particular do número de infecções provocadas por FIV. Nestes grupos de animais, registaram-se 25,2% (35/139) e 27,3% (3/11) de animais infectados por FIV e apenas 7,9% (11/139) e 9,1% (1/11) de animais infectados por FeLV, respectivamente.

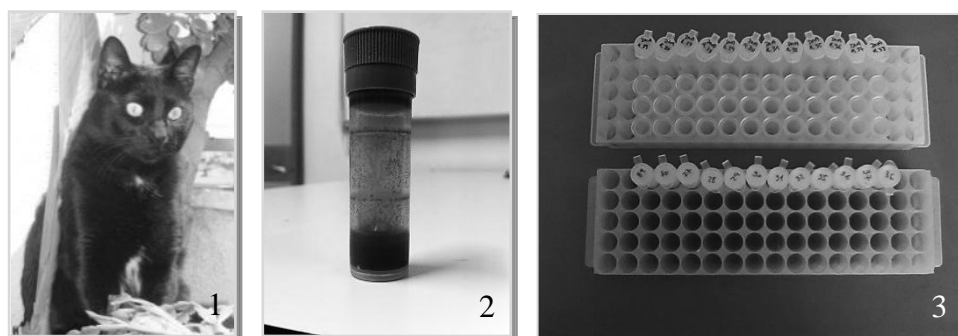
A positividade a FIV foi ainda detectada em 21,7% (18/83) dos animais pertencentes ao sexo feminino, tendo sido apenas detectada em 14,1% (12/85) dos animais do sexo masculino. A positividade a FeLV foi também superior nos animais do sexo feminino, no entanto a diferença entre géneros foi consideravelmente menor.

4.4 Colheita e processamento das amostras

A colheita de sangue foi apenas realizada no primeiro conjunto de amostras, que correspondia ao grupo de animais encaminhado às consultas do Hospital Escolar Veterinário da FMV durante o último mês do estágio curricular. O sangue foi colhido para tubos contendo anticoagulante EDTA e imediatamente processado para extracção de DNA total. (Figura 20) Nas restantes amostras, o DNA já tinha sido extraído previamente.

Foram ainda realizados testes serológicos em 203-206/236 animais (86-87,3%) para pesquisa de retrovírus, tendo sido utilizado o teste serológico (ELISA) DFV Test FIV/FeLV nos animais que foram testados no Hospital Escolar Veterinário da FMV-UL e ELISA indirecto da Virachek™, Synbiotics na restante população testada, para detecção de anticorpos específicos contra o FIV ou para detecção de antígenos de FeLV.

Figura 20 – Fotografias originais: 1- Um dos animais admitidos no estudo; 2- Amostra de sangue hemolisada após colheita; 3 - Processamento das amostras.



4.5 Extracção e quantificação dos ácidos nucleicos

O processo de extracção do DNA foi imediatamente efectuado após a recolha de cada uma das 50 amostras analisadas. Este procedimento foi realizado com o *Kit* comercial *DNeasyR Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, para extracção de DNA total a partir de amostras sanguíneas.

Numa primeira fase foram adicionados 20 µl de proteinase K e 200 µl de tampão desnaturante (AL) a 200 µl de sangue total, posteriormente incubados a 56°C durante 15 minutos. Após incubação, foram adicionados 200 µl de etanol absoluto para promover a precipitação do DNA na solução, que foi transferida de seguida para uma coluna de sílica para fixação do DNA. Após centrifugação a 16000xg durante 1 minuto, foram realizadas duas lavagens com os tampões recomendados no *kit* (AW1; AW2) nas mesmas condições de centrifugação. O DNA foi finalmente eluído da coluna através da adição de 200 µl do tampão aquoso AE e centrifugado para um novo microtubo estéril. (Figura 21)

O DNA foi posteriormente quantificado no espectrofotometro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific), e armazenado a -20°C até posterior utilização.

Figura 21 - Reagentes utilizados na extracção do DNA (Original)



4.6 Detecção de ácidos nucleicos

A detecção de hemoplasmas felinos foi realizada por diagnóstico molecular, utilizando a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, que permite a detecção, amplificação e quantificação da região amplificada enquanto a reacção está a decorrer (VanGuilder, Vrana, & Freeman, 2008). Esta técnica é efectuada num termociclador que quantifica a fluorescência emitida durante a amplificação do produto específico. (Figura 22) O sistema *TaqMan*® da *Applied Biosystems* foi o escolhido para a realização deste trabalho, requerendo um par de *primers* que delimitam a região alvo a amplificar e uma sonda específica marcada com um fluoróforo denominado *repórter* na extremidade 5' e um *quencher* ou supressor na extremidade 3'. Esta sonda, devido à diferença de T_m em relação aos *primers* específicos, vai ligar-se à região compreendida pelos *primers forward* e *reverse*, e enquanto não ocorre a extensão dos *primers* pela Taq polimerase o *quencher* inibe a emissão de fluorescência pelo *repórter*, devido ao seu afastamento com o *reporter*. Quando após a ligação dos *primers* à região do DNA complementar, se inicia a polimerização da nova cadeia, a presença da sonda a jusante da enzima, desencadeia a actividade de exonuclease 5'-3' da Taq polimerase levando à sua hidrólise, induzindo assim o afastamento entre o *reporter* e o *quencher* e a emissão de fluorescência pelo *reporter*, directamente proporcional à quantidade de produto final amplificado.

Para a detecção do *Mhf* e do *CMhm* foram utilizadas sondas TaqMan. Os *primers* e a sonda utilizados na detecção de *Mhf* foram calculados através do programa *Primer designing tool* do NCBI – (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), com base na sequência nucleotídica do gene 16S RNA, enquanto que, os *primers* e a sonda utilizados na detecção do *CMhm* foram os referidos por Tasker et al., (2003). (Tabela 1)

Para a detecção de *CMt* utilizou-se o sistema referido por Willi et al., (2005), que contém uma sonda com marcação *Minor Groove Binder* no extremo 3'. Esta molécula permite uma T_m superior para sondas de menores dimensões, garantindo assim uma maior sensibilidade e especificidade ao sistema (VanGuilder et al., 2008).

Figura 22 - Curvas (seta) que traduzem a fluorescência emitida durante a amplificação do produto específico. (Original)

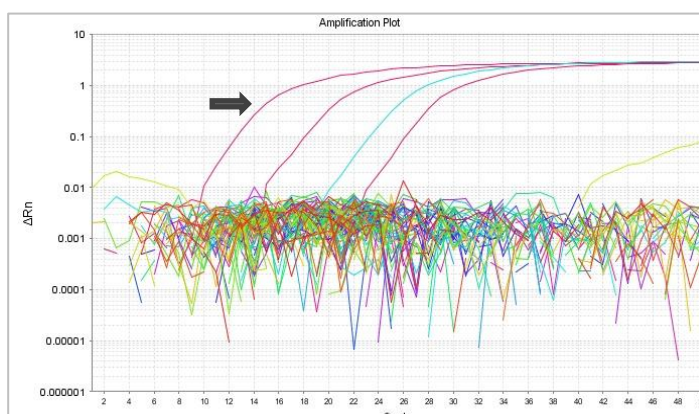


Tabela 1- Sequência dos *primers* e das sondas utilizadas nas reacções de PCR.

Espécie		Sequência (5' - 3')	5' Reporter/ 3' Quencher
<i>Mhf</i>	Fwd	CGGCCAAGGTTAGTGGCAAACGG	FAM/TAMRA
	Rev	TCCCTCAGCGCCCGAAGGCT	
	Sonda	ACATGCCCCTCTGTGGGGGATAGCCGCTTG	
<i>CMhm</i> ¹	Fwd	ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA	JOE/TAMRA
	Rev	ACGCCCAATAAATCCGRATAAT	
	Sonda	AGCTTGATAGGAAATGATTAAGCCTTGAA	
<i>CMt</i> ²	Fwd	GAAGGCCAGACAGGTCGTAAAG	FAM/MGB
	Rev	CTGGCACATAGTTWGCTGTCACTTA	
	Sonda	AAA TTT GAT GGT ACC CTC TGA	

Legenda da tabela: ¹ Dados retirados de Tasker et al., 2003.

² Dados retirados de Willi et al., 2005.

4.6.1 Controlos positivos e negativos utilizados nas reacções de PCR

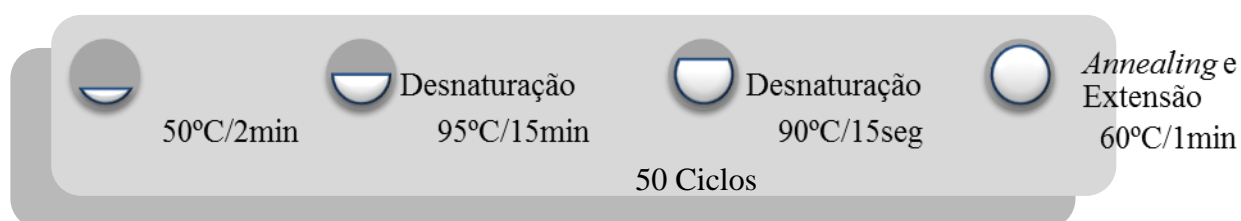
Nas reacções de PCR em tempo real para detecção de *Mhf* foi utilizado como controlo positivo um plasmídeo recombinante disponível no Laboratório de Virologia da FMV-UL. Nos PCRs de *CMhm* e *CMt* foi utilizada uma amostra positiva a cada uma das espécies como controlo positivo, previamente confirmadas por sequenciação do produto de amplificação. Como controlo negativo foi utilizada uma combinação dos reagentes do PCR com água MilliO® para perfazer o volume pretendido.

4.6.2 Reacção de PCR

O protocolo de PCR utilizado na detecção das três espécies de hemoplasmas foi equivalente. Para um volume de reacção de 20 µl, utilizou-se a *TaqMan® Gene Expression Master Mix 2x* concentrada, que inclui o tampão de reacção, a enzima e os dNTPs necessários, 0.9 µM de *primers forward* e *reverse*, 0.25 µM de sonda e 10-50ng de DNA.

As reacções foram amplificadas no termociclador *One Step Plus* (Applied Biosystems) ou no termociclador *Real-time 7300* (Applied Biosystems) utilizando o protocolo de amplificação padrão (95°C/15min; 50 ciclos a 90°C/15seg e 60°C/1min). (Figura 23)

Figura 23 – Ciclos térmicos utilizados no PCR em tempo real para as diferentes espécies.



4.7 Análise estatística

Para avaliar a significância da infecção provocada por hemoplasmas felinos, utilizou-se o teste exacto de Fisher, que permitiu validar a presença de associações significativas entre os resultados obtidos no PCR e as variáveis qualitativas em estudo. Foi também determinado o intervalo de confiança de 95% para as proporções de hemoplasmas obtidas na população em estudo e o Odds ratio com um intervalo de confiança de 95% para avaliar a significância dos factores de risco considerados no estudo.

Na interpretação dos resultados, foi considerado estatisticamente significativo um valor de $P < 0,05$.

Todos os dados apresentados foram calculados no programa IBM SPSS *Statistics* 20.0, com excepção do Odds ratio para os factores de risco, que foi determinado no site <http://www.vassarstats.net/>.

5. RESULTADOS

A prevalência geral de hemoplasmas detectada na população em estudo foi de 27,1% (64/236). Deste valor, cerca de 19,1 % (45/236) corresponde à presença de infecções únicas, provoadas por cada espécie de hemoplasmas isoladamente, enquanto os restantes 8,1% (19/236) representam o número de hemoplasmas presente em co-infecção.

A presença geral de *Mhf* na população foi de 14,4% (34/236), no entanto, desse valor, cerca de 7,6% (18/236) dos animais apresentavam infecções isoladas provocadas por este microorganismo, enquanto os restantes 6,8% (16/236) se encontravam co-infectados com outras espécies de hemoplasmas. O *CMhm* foi detectado em 17,8% (42/236) dos animais, surgindo unicamente em 10,6% (25/236) e em co-infecção nos restantes 7,2% (17/236), ao passo que o *CMt* foi encontrado em 5,9% (14/236) dos animais, dos quais apenas 0,8% (2/236) apresentavam infecção única provocada por este microorganismo e os restantes 5,1% (12/236) possuíam co-infecção com outros hemoplasmas. (Tabela 2)

A análise dos dados revela ainda a presença de co-infecções duplas e triplas na população, surgindo cerca de 3% (7/236) dos animais infectados simultaneamente por *Mhf* e *CMhm* e outros 3% (7/236) co-infectados pelas três espécies de hemoplasmas felinos. Os valores mais baixos foram encontrados nos animais co-infectados por *CMhm* e *CMt* em cerca de 1,3% (3/236) das amostras e por *CMt* e *Mhf*, que registaram valores de apenas 0,8% (2/236).

Tabela 2 - Prevalência de animais positivos a hemoplasmas e o respectivo intervalo de confiança de 95%.

Frequência espécies	Nº Positivos	Proporção (%)	IC 95%
Espécies <i>Mycoplasma</i>	64/236	27.1	21.6-33.1
<i>Mhf</i> (IU+CoI)	34/236	14.4	10.1-18.6
<i>CMhm</i> (IU+CoI)	42/236	17.8	13.1-22.9
<i>CMt</i> (IU+CoI)	14/236	5.9	2.9-8.9
<i>Mhf</i> (IU)	18/236	7.6	4.2-11.4
<i>CMhm</i> (IU)	25/236	10.6	6.3-14.9
<i>CMt</i> (IU)	2/236	0.8	0.0-2.1
<i>Mhf</i> + <i>CMhm</i>	7/236	3	1.3-5.5
<i>CMhm</i> + <i>CMt</i>	3/236	1.3	0.0-2.5
<i>CMt</i> + <i>Mhf</i>	2/236	0.8	0.0-2.1
<i>Mhf</i> + <i>CMhm</i> + <i>CMt</i>	7/236	3	0.8-5.1

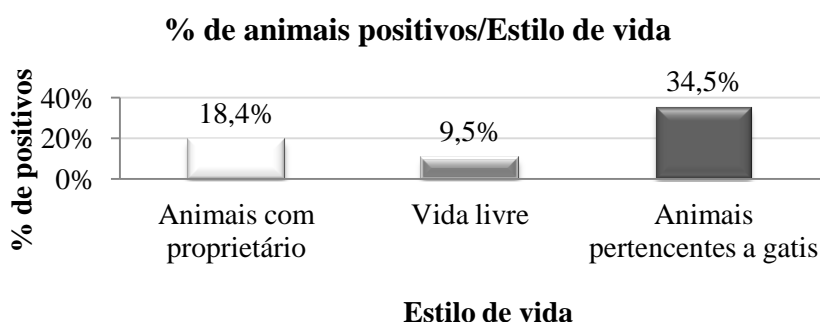
Legenda da tabela: (IU+CoI) – Infecção única e co-infecção

5.1 Avaliação da prevalência dos hemoplasmas felinos de acordo com as variáveis definidas

5.1.1 Relativamente ao estilo de vida

Da avaliação das 236 amostras, detectou-se uma prevalência geral de hemoplasmas de 18,4% (14/76) para o grupo de animais com proprietário; 9,5% (2/21) para o grupo de animais de vida livre e cerca de 34,5% (48/139) para o grupo de animais pertencentes a gatis. (Gráfico 8)

Gráfico 8 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o estilo de vida.

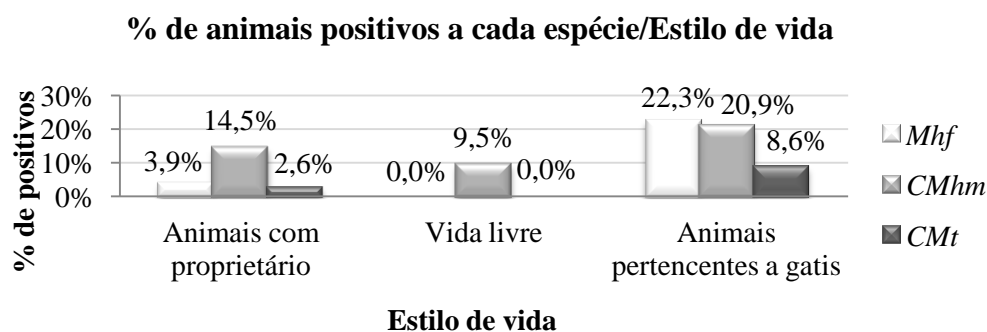


O grupo de animais com proprietário revelou um predomínio do número de animais infectados por *CMhm*, detectado em 14,5% (11/76) dos animais; seguido do *Mhf* e do *CMt* apenas detectados em 3,9% (3/76) e 2,6% (2/76) respectivamente.

No grupo de animais de vida livre, pertencente à região do Alentejo, foi apenas detectada a presença de *CMhm*, em cerca de 9,5% (2/21) dos animais.

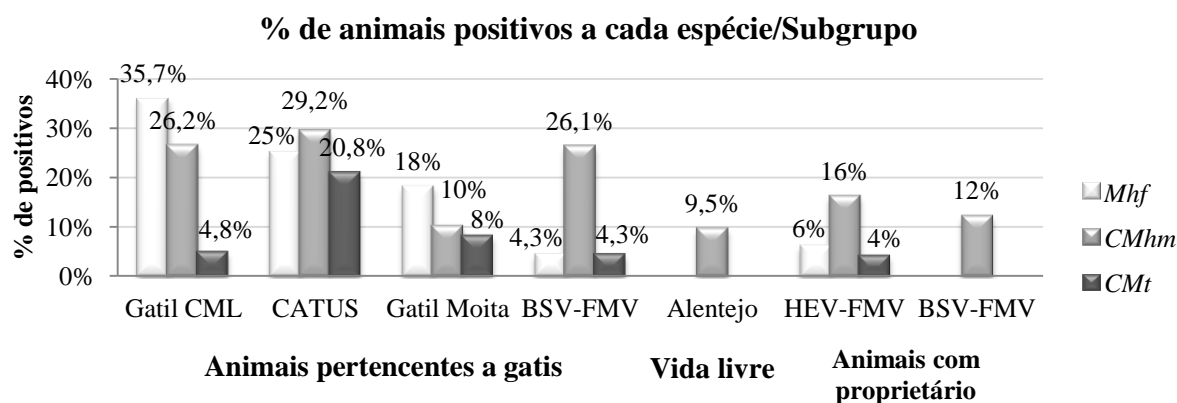
No que diz respeito ao grupo de animais pertencentes a gatis, o *Mhf* foi detectado maioritariamente em 22,3% (31/139) dos animais, seguido do *CMhm* em 20,9% (29/139) e do *CMt* em apenas 8,6% (12/139). (Gráfico 9)

Gráfico 9 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas por estilo de vida.



No grupo de animais pertencentes a gatis foi encontrado um maior número de gatos infectados por *Mhf*, contrariamente ao que se verificou nos animais de vida livre e nos animais com proprietário, que revelaram um aumento de infecções provocadas por *CMhm* (gráfico 9). No entanto, quando analisados os subgrupos individualmente, verificou-se que os gatos pertencentes à associação Catus e o grupo de animais do BSV proveniente de gatis, revelaram um número superior de animais positivos a *CMhm*, como ocorre nos animais de vida livre e nos animais com proprietário. (Gráfico 10)

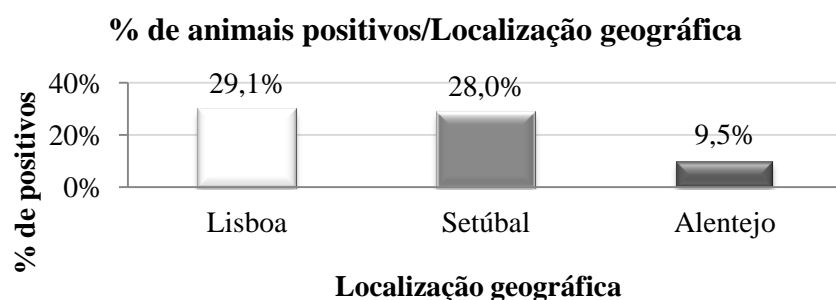
Gráfico 10 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas por conjunto amostral.



5.1.2 Relativamente à localização geográfica

Considerando a localização geográfica dos animais admitidos no estudo, foram encontrados valores de positividade a hemoplasmas em 29,1% (48/165) dos gatos do distrito de Lisboa, em 28% (14/50) dos animais de Setúbal e em 9,5% (2/21) dos gatos da região do Alentejo. (Gráfico 11)

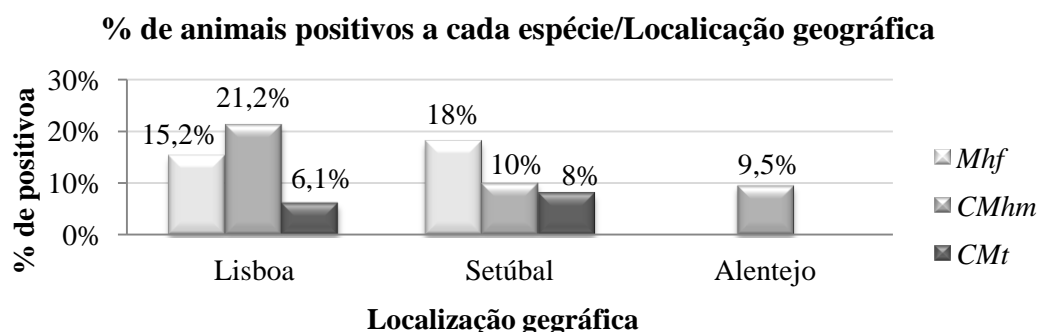
Gráfico 11 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com a localização geográfica.



No distrito de Lisboa verificou-se um predomínio de infecções provocadas por *CMhm* em 21,2% (35/165) dos animais, seguido da presença de *Mhf* e de *CMt* em 15,2% (25/165) e 6,1% (10/165) dos gatos testados, respectivamente. Pelo contrário, no distrito de Setúbal, verificou-se um predomínio de *Mhf* em cerca de 18% (9/50) dos gatos, seguido da presença de *CMhm* e de *CMt* em 10% (5/50) e 8% (4/50) dos animais, respectivamente.

No Alentejo foram apenas identificados 9,5 % (2/21) dos animais infectados com *CMhm*, não tendo sido detectada a presença de *Mhf* e *CMt*. (Gráfico 12)

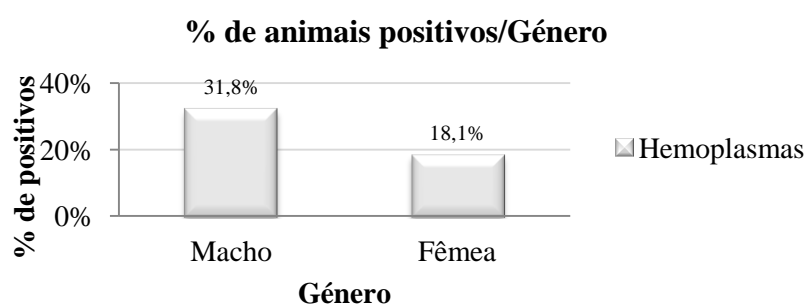
Gráfico 12 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com a localização geográfica.



5.1.3 Relativamente ao género

Das 168 amostras analisadas para o género, cerca de 25% (42/168) apresentou positividade a hemoplasmas, sendo que, 31,8% (27/85) pertenciam ao género masculino e apenas 18,1% (15/83) ao sexo feminino. (Gráfico 13)

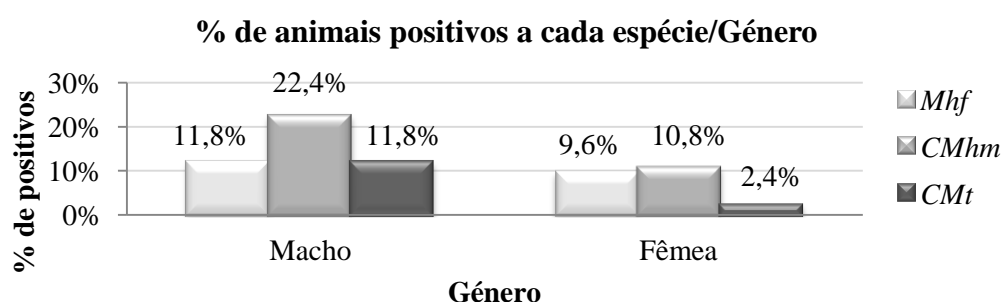
Gráfico 13 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o género.



Nos machos, foi encontrada uma percentagem superior de infecções provocadas por *CMhm* em 22,4% (19/85) dos animais, seguida do *Mhf* e do *CMt* ambos com 11,8% (10/85).

Apesar do número de infecções por hemoplasmas ser inferior no género feminino, verificou-se um predomínio da presença de *CMhm* e de *Mhf* em 10,8% (9/83) e em 9,6% (8/83) dos animais, respectivamente, surgindo o *CMt* em apenas 2,4% (2/83). (Gráfico 14)

Gráfico 14 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com o género.



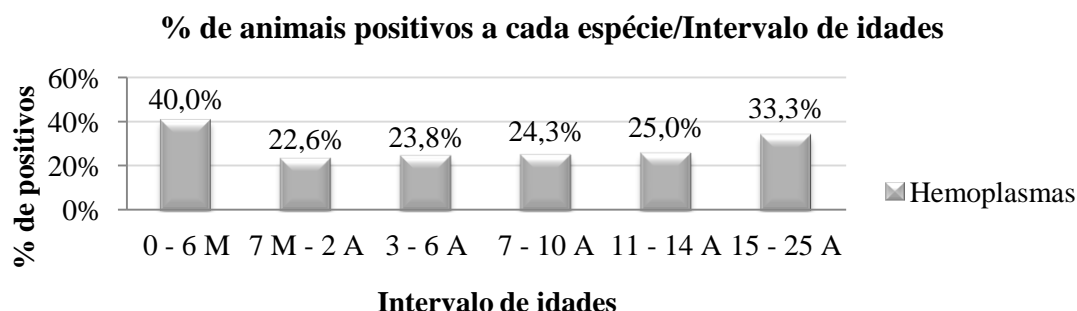
5.1.4 Relativamente ao intervalo de idades

Das 150 amostras analisadas com informação relativa às idades, foi detectada uma prevalência geral de hemoplasmas de 24,7% (37/150)

Considerando os diferentes intervalos, obteve-se uma prevalência de hemoplasmas de 40% (2/5) para o grupo de animais com idades entre os 0 e os 6 meses de idade; 22,6% (7/31) no intervalo dos 7 meses aos 2 anos; 23,8% (15/63) no grupo de animais dos 3 aos 6 anos; 24,3% (9/37) para os gatos dos 7 aos 10 anos; 25% (2/8) no intervalo dos 11 aos 14 anos e 33,3% (2/6) nos gatos dos 15 aos 25 anos. (Gráfico 15)

De uma maneira geral, foram detectadas infecções por hemoplasmas em todos os intervalos considerados, tendo sido, no entanto, identificada maior proporção de animais infectados no grupo de animais mais jovem, com idades entre os 0 e os 6 meses e no grupo que detém os animais mais velhos, dos 15 aos 25 anos.

Gráfico 15 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o intervalo de idades.

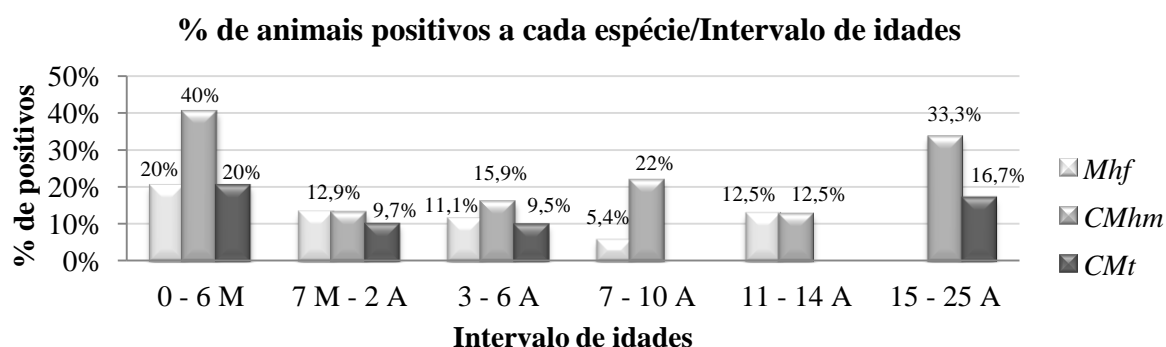


A infecção provocada por *Mhf* foi maioritariamente detectada no intervalo de idades dos 0 aos 6 meses, em 20% (1/5) dos gatos testados. Foi também encontrada, ainda que em menor percentagem (< 12,9%), nos restantes intervalos de idades, com excepção do grupo de gatos dos 15 aos 25 anos que não revelou positividade à infecção provocada por este microorganismo.

O *CMhm* foi maioritariamente encontrado no grupo de gatos jovens dos 0 meses aos 6 meses, nos animais adultos dos 7 aos 10 anos e no intervalo dos 15 aos 25 anos, com percentagens de 40% (2/5), 22% (8/37) e 33,3% (2/6), respectivamente. Esta espécie foi também encontrada nos restantes intervalos com valores iguais ou inferiores a 15,9%.

A presença de *CMt* surgiu maioritariamente nos gatos com idades compreendidas entre os 0 e os 6 meses de idade e entre os 15 e os 25 anos, com valores de 20% (1/5) e 16,7% (1/6) respectivamente. Foi ainda detectado nos grupos de animais dos 7 meses aos 2 anos e dos 3 aos 6 anos com prevalências de 9,7% e 9,5%, respectivamente, não tendo sido detectado no intervalo dos 7 aos 14 anos. (Gráfico 16)

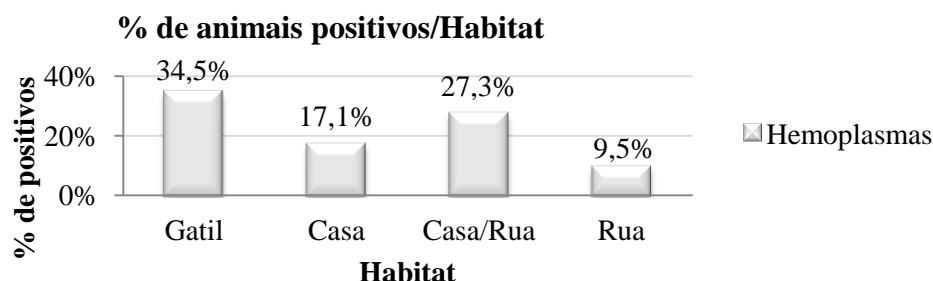
Gráfico 16 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com o intervalo de idades.



5.1.5 Relativamente ao habitat

Das 212 amostras com informação acerca do habitat, determinou-se uma percentagem geral de hemoplasmas de 28,3% (60/212). Neste critério, observou-se uma superioridade de hemoplasmas nos grupos de gatos pertencentes a gatis e nos gatos de casa com acesso esporádico à rua, com percentagens de 34,5% (48/139) e 27,3% (3/11), respectivamente. No grupo de animais de interior exclusivo foi detectada infecção em 17,1% (7/41) dos animais, enquanto que no grupo de animais de vida livre do Alentejo foram apenas registadas cerca de 9,5% (2/21). (Gráfico 17)

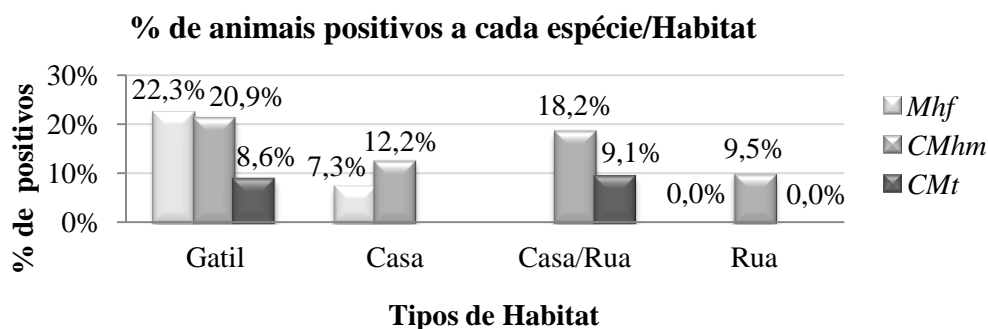
Gráfico 17 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o habitat.



No grupo de animais pertencentes a gatis verificou-se um predomínio de infecções provocadas por *Mhf* e *CMhm*, em 22,3% (31/139) e 20,9% (29/139) dos animais respectivamente, surgindo o *CMt* em apenas 8,6% (12/139).

No grupo de animais de interior exclusivo, assim como no grupo de animais com acesso esporádico à rua, obteve-se um predomínio de *CMhm* em 12,2% (5/41) e em 18,2% (2/11) dos animais, respectivamente. No entanto, nos animais de interior exclusivo foi ainda encontrada a presença de *Mhf* em 7,3% (3/41) dos animais, enquanto que os animais com acesso esporádico à rua revelaram a presença de *CMt* em 9,1% (1/11). Nos animais de vida livre, foi apenas detectada a presença de *CMhm* em 9,5% (2/21) dos animais. (Gráfico 18)

Gráfico 18 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com o habitat.



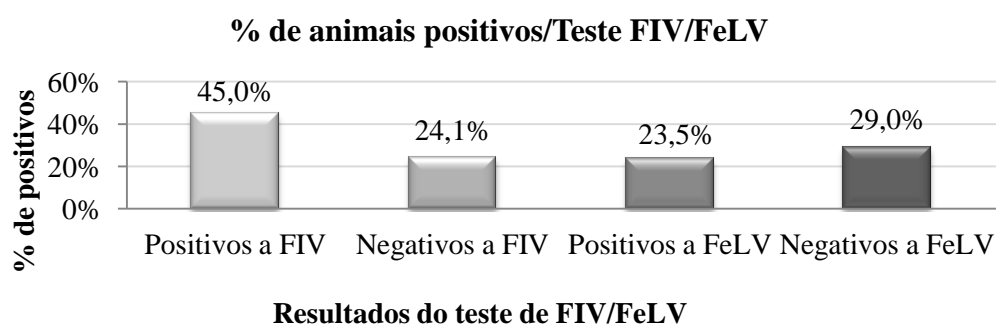
5.1.6 Relativamente à presença de retrovírus

A prevalência geral de hemoplasmas no grupo de animais testados para FIV e FeLV, foi de 28,2% (58/206) e 28,6% (58/203), respectivamente.

Do grupo de gatos positivo a FIV (40/206), cerca de 45% (18/40) apresentou co-infecção por hemoplasmas, contrariamente ao grupo de animais negativo para este vírus (166/206) que revelou uma percentagem de apenas 24,1% (40/166).

Do grupo de animais positivo a FeLV (17/203), verificou-se uma percentagem de co-infecção por hemoplasmas de 23,5% (4/17), inferior ao grupo de gatos negativo para este vírus (186/203), que exibiu valores de 29,0% (54/186). (Gráfico 19)

Gráfico 19 - Distribuição dos animais positivos a hemoplasmas de acordo com o resultado do teste para pesquisa de retrovírus.

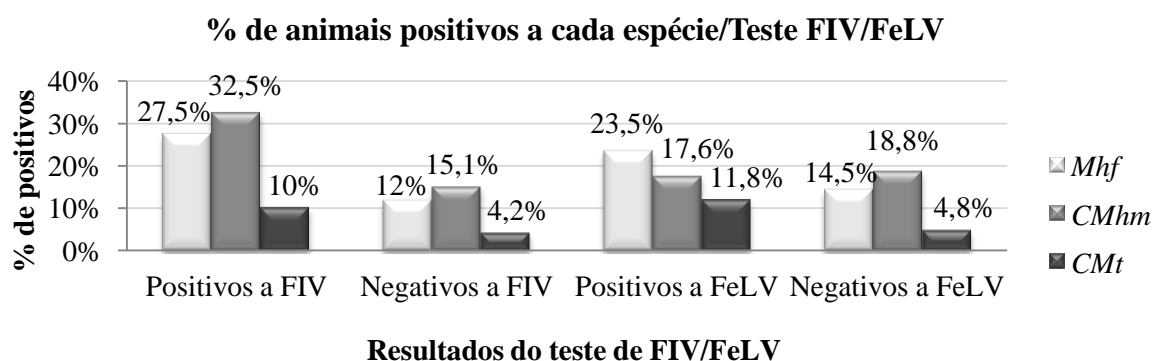


Verificou-se maior proporção de hemoplasmas, independentemente da espécie, no grupo de animais infectados por FIV relativamente à proporção encontrada no grupo de animais infectados por FeLV.

O grupo de animais positivo a FIV (40/206) registou maiores taxas de infecção, apresentando 27,5% (11/40) dos animais infectados por *Mhf*; 32,5% (13/40) infectados por *CMhm* e cerca de 10% (4/40) infectados por *CMt*. O grupo de animais negativos a FIV (166/206), apesar de registar menor número de infecções, revela igualmente um aumento da presença de *CMhm* em 15,1% (25/166) dos animais, seguida da presença de *Mhf* e *CMt* em 12,0% (20/166) e 4,2% (7/166), respectivamente.

Em contrapartida, nos animais positivos a FeLV (17/203), foi detectado um maior número de infecções provocadas pelo *Mhf* em 23,5% (4/17) dos animais, surgindo o *CMhm* e o *CMt* em 17,6% (3/17) e em 11,8% (2/17), respectivamente. O grupo de animais negativo a FeLV (186/203), registou tal como os restantes grupos, um aumento de animais infectados por *CMhm* em 18,8% (35/186) dos animais, seguindo-se a presença de *Mhf* e do *CMt* em 14,5% (27/186) e em 4,8% (9/186), respectivamente. (Gráfico 20)

Gráfico 20 - Distribuição dos animais positivos a cada espécie de hemoplasmas de acordo com os resultados do teste para pesquisa de retrovírus.



A prevalência de animais positivos a hemoplasmas mencionada nesta secção e representada sob a forma de gráficos, encontra-se sumariada nas tabelas 7 e 9 dos anexos 10.2.1 e 10.2.2, respectivamente.

5.2 Avaliação do tipo de infecção (IU/CoI), de acordo com as variáveis definidas

As prevalências de hemoplasmas mencionadas englobam tanto o número de microorganismos que surge isoladamente num indivíduo (IU) como aqueles que surgem em co-infecção (CoI), não permitindo a distinção entre os dois tipos de infecção nem a análise da sua relação com os factores de risco. Deste modo, foi também avaliada a ocorrência isolada dos dois tipos de infecção na população de gatos em estudo, tendo-se verificado a existência de algumas associações entre o tipo de infecção e as diferentes variáveis consideradas. (Tabela 3).

A presença isolada de *Mhf* foi maioritariamente detectada nos animais com proprietário; nos animais provenientes do distrito de Setúbal, que fazem parte do grupo de animais pertencentes a gatis; nas fêmeas; nos animais mais velhos, dos 11 aos 14 anos; nos animais de interior exclusivo e nos animais negativos a retrovírus. Em contrapartida, a sua presença em co-infecção foi maioritariamente detectada nos animais de Lisboa; nos machos; nos animais mais jovens dos 0 aos 6 meses de idade e nos jovens adultos dos 3 aos 6 anos, assim como, nos gatos positivos a retrovírus.

A presença de *CMhm* foi maioritariamente detectada em infecções isoladas, excepto nos animais infectados por retrovírus, onde foi maioritariamente encontrado na presença de outras espécies de hemoplasmas. Em contrapartida, a presença de *CMt* foi maioritariamente detectada em co-infecção em quase todas as variáveis analisadas, exceptuando o grupo de animais com acesso esporádico à rua, onde esta espécie foi encontrada maioritariamente em infecções isoladas.

Tabela 3 – Prevalência de hemoplasmas de acordo com o tipo de infecção, tendo em conta as variáveis em estudo.

	% <i>Mhf</i>		% <i>CMhm</i>		% <i>CMt</i>	
	IU	CoI	IU	CoI	IU	CoI
Estilo de vida (n=236)						
Animais com proprietário (n=76)	2,6%	+	1,3 %	11,8% + 2,7%	1,3%	1,3%
Animais de vida livre (n=21)			9,5% +			
Animais pertencentes a gatis (n=139)	11,5%	10,8%	10,1%	10,8%	0,7%	+ 7,9%
Localidade (n=236)						
Lisboa (n=165)	6,7%	+ 8,5%	12,1% + 9,1%	0,6%	+ 5,5%	
Setúbal (n=50)	14% +	4%	6% + 4%	2%	+ 6%	
Alentejo (n=21)			9,5% +			
Género (n=168)						
Machos (n=85)	4,7%	+ 7,1%	14,1% + 8,2%	2,4%	+ 9,4%	
Fêmeas (n=83)	7,2% +	2,4%	8,4% + 2,4%		+ 2,4 %	
Idade (n=150)						
0 – 6 Meses (n=5)		+ 20%	20%	20%		+ 20%
7 Meses – 2 Anos (n=31)	6,5%	6,5%	6,5%	6,5%	3,2%	+ 6,5%
3 - 6 Anos (n=63)	4,8%	+ 6,3%	9,5% + 6,3%		+ 9,5%	
7 – 10 Anos (n=37)	2,7%	2,7%	18,9% + 2,7%			
11 – 14 Anos (n=8)	12,5% +		12,5% +			
15 – 25 Anos (n=6)			16,7% +		+ 16,7%	
Habitat (n=212)						
Gatil (n=139)	11,5%	10,8%	10,1%	10,8%	0,7%	+ 7,9%
Interior exclusivo (n=41)	4,9% +	2,4%	9,8% + 2,4%			
Acesso esporádico à rua (n=11)			18,2% +		9,1% +	
Vida livre (n=21)			9,5% +			
Teste de FIV (n=206)						
Positivo (n=40)	10%	+ 17,5%	15%	+ 17,5%		+ 10%
Negativo (n=166)	7,8% +	4,2%	10,2% + 4,8%	1,2%	+ 3,0%	
Teste de FeLV (n=203)						
Positivo (n=17)	5,9%	+ 17,6%		+ 17,6%		+ 11,8%
Negativo (n=186)	8,6% +	5,9%	12,4% + 6,5%	1,1%	+ 3,8%	

Legenda da tabela: IU - Infecção única; CoI – Co-infecção
 + - Aumento do número de infecções

5.3 Avaliação do tipo de co-infecção de acordo com as variáveis definidas

Algumas espécies de hemoplasmas surgem frequentemente em co-infecção, tendo-se verificado que algumas associações entre espécies ocorrem com maior frequência em detrimento de outras, dependendo da interacção com factores de risco. (Tabela 4)

O grupo de animais pertencentes a gatis obteve taxas de co-infecção superiores aos animais de vida livre e àqueles com proprietário, registando percentagens de co-infecção de 12,2% (17/139). Verificou-se ainda um aumento da presença de co-infecções triplas e da presença simultânea de *Mhf* e *CMhm*. (Gráfico 22 – Anexo 10.2.4)

De acordo com localização geográfica dos animais em estudo, detectaram-se taxas de co-infecção de 9,7% (16/165) nos gatos provenientes do distrito de Lisboa, superiores às registadas para os animais de Setúbal. Também nesta região foi notória a co-infecção com *Mhf* e *CMhm* assim como a presença das três espécies de hemoplasmas. Nos animais de vida livre do Alentejo não foi identificada a presença de co-infecções. (Gráfico 23 – Anexo 10.2.4)

A percentagem de co-infecção foi também superior no sexo masculino, tendo sido registada em 10,6% (9/85) dos animais. Neste grupo, foi maioritariamente detectada a presença de co-infecção com as três espécies de hemoplasmas, assim como a presença simultânea de *CMhm* e *CMt*, ao contrário dos animais do sexo feminino, que registaram apenas a presença concomitante das três espécies de hemoplasmas. (Gráfico 24 – Anexo 10.2.4)

Dentro dos intervalos de idade, obteve-se uma taxa de co-infecção superior nos animais mais jovens dos 0 aos 6 meses de idade, e nos mais velhos, dos 15 aos 25 anos, registando valores de 20% (1/5) e 16,7% (1/6), respectivamente. Nos restantes intervalos, verificou-se a presença de co-infecção em 9,5% (6/63) dos animais jovens adultos dos 3 aos 6 anos; em 5,4% (2/31) dos animais dos 7 meses aos 2 anos e em 2,7% (1/37) dos animais dos 7 aos 10 anos. O tipo de co-infecção variou grandemente com os intervalos de idade considerados, tendo sido maioritariamente detectada a presença de co-infecção com as três espécies de hemoplasmas nos animais mais jovens, dos 0 meses aos 2 anos de idade e a presença simultânea de *CMhm* e *CMt* nos animais mais velhos, entre os 15 e os 25. (Gráfico 25 – Anexo 10.2.4)

Também na análise do habitat se verificou uma percentagem de co-infecção superior no grupo de animais pertencentes a gatis, em relação aos animais de interior exclusivo, não tendo sido detectada a presença de co-infecções nos animais de vida livre e naqueles com acesso esporádico à rua. (Gráfico 26 – Anexo 10.2.4)

A infecção por retrovírus também parece estar associada com o aumento da presença de co-infecções, tendo-se registado valores de 20% (8/40) nos gatos positivos a FIV e 17,7% (3/17) nos gatos positivos a FeLV. No grupo de animais positivo a FIV verificou-se um predomínio da presença simultânea de *Mhf* e *CMhm*, enquanto nos animais positivos a FeLV, se

encontrou um aumento do número de animais co-infectados com as três espécies de hemoplasmas. Verificou-se ainda que, dos três gatos positivos a FIV e a FeLV, apenas um deles apresentou positividade a hemoplasmas, exibindo co-infecção com as três espécies em estudo. (Gráfico 27 – Anexo 10.2.4)

De uma forma geral, os tipos de co-infecção maioritariamente detectados corresponderam à presença simultânea de *Mhf* e *CMhm*, assim como à presença de co-infecções triplas, surgindo ambas em 3% (7/236) dos animais em estudo. (Gráfico 21 – Anexo 10.2.4)

Tabela 4 – Prevalência e tipos de co-infecção, tendo em conta as variáveis em estudo.

	3 Espécies	<i>MhfxCMhm</i>	<i>CMhmxCMt</i>	<i>MhfxCMt</i>
Estilo de vida (n=236)				
Animais com proprietário (n=76)		1,3% (1/76)	1,3% (1/76)	
Animais de vida livre (n=21)				
Animais pertencentes a gatis (n=139)	5% + (7/139)	4,3% + (6/139)	1,4% (2/139)	1,4% (2/139)
Localidade (n=236)				
Lisboa (n=165)	3,6% + (6/165)	4,2% + (7/165)	1,2% (2/165)	0,6% (1/165)
Setúbal (n=50)	2% (1/50)		2% (1/50)	2% (1/50)
Alentejo (n=21)				
Género (n=168)				
Machos (n=85)	3,5% + (3/85)	1,2% (1/85)	3,5% + (3/85)	2,4% (2/85)
Fêmeas (n=83)	2,4% + (2/83)			
Idade (n=150)				
0 – 6 Meses (n=5)	20% + (1/5)			
7 Meses – 2 Anos (n=31)	6,5% + (2/31)			
3 - 6 Anos (n=63)	3,2% (2/63)		3,2% (2/63)	3,2% (2/63)
7 – 10 Anos (n=37)		2,7% + (1/37)		
11 – 14 Anos (n=8)				
15 – 25 Anos (n=6)			16,7% + (1/6)	
Habitat (n=212)				
Gatil (n=139)	5% + (7/139)	4,3% + (6/139)	1,4% (2/139)	1,4% (2/139)
Interior exclusivo (n=41)		2,4% + (1/41)		
Acesso esporádico à rua (n=11)				
Vida livre (n=21)				

Tabela 4 (continuação) - Prevalência e tipos de co-infecção, tendo em conta as variáveis em estudo.

	3 Espécies	<i>MhfxCMhm</i>	<i>CMhmxCMt</i>	<i>MhfxCMt</i>
Teste de FIV (n=206)				
Positivo (n=40)	5% (2/40)	10% + (4/40)	2,5% (1/40)	2,5% (1/40)
Negativo (n=166)	2,4% + (4/166)	1,8% (3/166)	0,6% (1/166)	
Teste de FeLV (n=203)				
Positivo (n=17)	11,8% + (2/17)	5,9% (1/17)		
Negativo (n=186)	2,2% (4/186)	3,2% + (6/186)	1,0% (2/186)	0,5% (1/186)

Legenda da tabela: + - Aumento do número de infecções

5.4 Avaliação da significância para os factores de risco considerados no estudo

A positividade a hemoplasmas foi, no presente estudo, associada significativamente com o estilo de vida dos animais e o seu habitat, tendo sido encontrado um predomínio destes microorganismos no grupo de animais pertencentes a gatis ($P=0,007$; $0,031$). Quando analisadas as espécies individualmente, observou-se um aumento significativo de *Mhf* ($P=0,000$; $0,001$) neste grupo de animais, não tendo sido, no entanto, encontrada associação significativa com o *CMhm* e o *CMt*, apesar de surgirem igualmente em maior número neste grupo de animais. Na análise do género, também se verificou uma associação significativa entre o elevado número de machos e a infecção por *CMt* ($P=0,032$), não tendo sido, no entanto, encontrada associação com as outras espécies de hemoplasmas, apesar de existir, como observado acima, um maior número de machos infectados nas três espécies estudadas ($P=0,05$). Foi também detectada significância entre a proporção de hemoplasmas felinos e a presença de infecção por FIV ($P=0,011$), tendo sido, encontrado um predomínio significativo de *Mhf* ($P=0,024$), *CMhm* ($P=0,021$) e co-infecção com estas duas espécies ($P=0,028$), nos animais infectados por FIV, facto que não se verificou com o *CMt* e as restantes co-infecções, quando analisadas as espécies individualmente e em co-infecção.

A presença das três espécies de hemoplasmas isoladamente e em co-infecção foi também avaliada, tendo-se verificado um predomínio significativo da presença de *CMt* em co-infecção, relativamente à sua presença em infecções isoladas ($P=0,012$).

Não foi encontrada qualquer associação significativa entre a presença de hemoplasmas felinos e a localização geográfica dos animais, a idade e a infecção por FeLV, mesmo quando analisadas as espécies individualmente. (Tabela 5)

Tabela 5 – Análise da significância entre a presença de infecção e os factores de risco considerados.

Variáveis	Descrição	P
Estilo de vida (n=236)	Vida livre (Alentejo) (n=21)/ Pertencentes a gatis (n=139)/ Animais com proprietário (n=76)	0,007 (0,000 – <i>Mhf</i>)
Localidade (n=236)	Lisboa (n= 165)/ Setúbal (n=50)/ Alentejo (n=21)	0,160
Género (n=168)	Macho (n=85)/ Fêmea (n=83)	0,05 (0,032 – <i>CMt</i>)
Idade (n=150)	0-6 Meses (n=5)/ 7 Meses-2 Anos (n=31)/ 3-6 Anos (n=63)/ 7-10 Anos (n=37)/ 11-14 Anos (n=8)/ 15-25 Anos (n=6)	0,932
Habitat (n=212)	Gatil (n=139)/ Casa (n=41)/ Casa/Rua (n=11)/ Rua (n=21)	0,031 (0,001- <i>Mhf</i>)
Teste de FIV (n=206)	Positivo (n=40)/ Negativo (n=166)	0,011 <i>0,024 – Mhf</i> <i>0,021 – CMhm</i> <i>0,028 – Mhf/CMhm</i>
Teste de FeLV (n=203)	Positivo (n=17)/ Negativo (n=186)	0,783
Tipo de infecção	<i>Mhf</i> (IU/CoI), <i>CMhm</i> (IU/CoI), <i>CMt</i> (IU/CoI)	0,012 (<i>CMt/CoI</i>)

A análise dos factores de risco, através do emprego do teste de razão de possibilidades (Odds ratio) demonstrou ainda, que os gatos oriundos da região de Lisboa se encontram em maior risco de contrair infecção por hemoplasmas (OR=3,85), assim como os gatos pertencentes ao sexo masculino (OR=2,11), aqueles com acesso à rua e pertencentes a gatis (OR=2,01;OR=2,18) e os animais positivos a FIV (OR=2,58). A idade (OR=1,05) e a positividade a FeLV (OR=0,75) não foram associadas com a maior probabilidade em contrair infecção por hemoplasmas neste estudo. (Tabela 6)

Tabela 6 - Análise dos factores de risco de acordo com o teste de razão de possibilidades.

Factores de risco	Descrição	OR	IC 95%
Estilo de vida (n=236)	Vida livre + Gatil (n=160) / Com proprietário (n=76)	2,01	1,03 – 3,93
Localidade (n=236)	Lisboa (n=215) / Alentejo (n=21)	3,85	0,87 - 17,02
Género (n=168)	Macho (n=85) / Fêmea (n=83)	2,11	1,03 - 4,34
Idade (n=150)	0M – 6A (n=99) / 7A – 25A (n=51)	1,05	0,49 – 2,24
Habitat (n=212)	Acesso à rua + Gatil (n=171) / Interior exclusivo (n=41)	2,18	0,91 – 5,24
Teste FIV (n=206)	Positivo (n=40) / Negativo (n=166)	2,58	1,26 - 5,28
Teste FeLV (n=203)	Positivo (n=17) / Negativo (n=186)	0,75	0,23 - 2,41

6. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

A realização deste estudo permitiu a avaliação da prevalência de hemoplasmas felinos em diferentes populações de gatos, assim como a avaliação da significância dos factores de risco envolvidos no estabelecimento da infecção. Este estudo documenta assim a presença de *Mhf*, *CMhm* e *CMt* numa população de gatos infectados naturalmente, oriundos de diferentes regiões do país, com diferentes estilos de vida e habitats.

Obteve-se uma prevalência geral de hemoplasmas de 27,1% (64/236), sendo que, desse valor 14,4% (34/236) correspondem à presença de *Mhf*, 17,8% (42/236) à presença de *CMhm* e cerca de 5,9% (14/236) à presença de *CMt*. Estes dados diferem dos resultados obtidos noutro estudo efectuado no Norte e Centro de Portugal, onde foram documentadas prevalências gerais de hemoplasmas felinos de 43,43%, similares à proporção detectada para os hemoplasmas caninos em Portugal (Martinez-Diaz et al., 2013). O estudo registou ainda valores de 12,81% para a presença de *Mhf*, 41,56% para a presença de *CMhm* e cerca de 1,25% para o *CMt*. Embora os valores apresentados sejam superiores aos encontrados no presente trabalho, com aumento significativo do *CMhm* em particular, deve ter-se em linha de conta as diferenças encontradas nas populações de gatos incluídas em ambos os estudos, tanto no que diz respeito ao tamanho populacional das amostras, como ao habitat e/ou ao estado clínico dos animais.

As percentagens de infecção detectadas não diferem grandemente dos valores reportados noutros países da Europa, onde a prevalência geral de hemoplasmas felinos, de acordo com a bibliografia revista, se encontra entre os 12,2% e os 43,43% (Gentilini et al., 2009; Juvet et al., 2010; Laberke et al., 2010; Martinez-Diaz et al., 2013; Roura et al., 2010; Willi et al., 2006a). Estima-se que a prevalência de *Mhf* se situe entre os 0,2% e os 66,6% (Criado-Fornelio et al., 2003; Willi et al., 2006c); no entanto, este último valor corresponde a um estudo que contém uma amostra reduzida de animais suspeitos de hemoplasmosse. Na maior parte dos estudos revistos, a prevalência de *Mhf* na Europa é igual ou inferior a 12,81% (Gentilini et al., 2009; Martinez-Diaz et al., 2013; Roura et al., 2010; Willi et al., 2006a). A presença de *CMhm* continua a ser detectada com maior frequência, registando valores de 7% a 41,56% (Martinez-Diaz et al., 2013; Willi et al., 2006c), ao passo que a presença de *CMt* surge apenas entre 0,3% e 1,7% das populações estudadas (Laberke et al., 2010; Peters et al., 2008a).

Mundialmente, a prevalência de infecção por hemoplasmas felinos situa-se entre os 4% e os 44,9% (Kamrani et al., 2008; Lobetti & Tasker, 2004), estando descrita uma prevalência de infecção por *Mhf* de 0,4% a 70% (Kewish, Appleyard, Myers, Kidney, & Jackson, 2004; Sykes et al., 2007b). Este último valor representa os estudos que possuem animais suspeitos de hemoplasmosse ou aqueles com dimensões populacionais reduzidas, sendo documentadas

na maior parte dos estudos, prevalências inferiores a 10% (Bortoli et al., 2012; Hackett et al., 2006; Ishak, Radecki, & Lappin, 2007; Luria et al., 2004; Sykes et al., 2008a; Tasker et al., 2004a). A presença de *CMhm* surge quase sempre em proporções superiores às restantes espécies, variando de 3,3% a 50% (Kamrani et al., 2008; Macieira et al., 2008; Tasker et al., 2004a), sobretudo quando são testados animais positivos a retrovírus. Em contrapartida, a prevalência de *CMt* é quase sempre inferior às prevalências documentadas para as restantes espécies, tendo registado valores de apenas 0,4 a 10% (Fujihara et al., 2007; Sykes et al., 2007b; Sykes et al., 2008a).

A comparação dos trabalhos realizados em diferentes países ou localidades torna-se difícil devido às diferenças populacionais dos animais testados, localização e características climáticas em que os mesmos se encontram, e/ou às diferenças entre critérios de inclusão, técnicas de diagnóstico e métodos estatísticos utilizados (Martinez-Diaz et al., 2013).

Para avaliar a significância dos factores de risco na infecção e a forma como estes microorganismos afectam as diferentes populações de animais, os mesmos foram agrupados consoante o seu estilo de vida, tendo-se obtido um aumento do número de infecções nos animais pertencentes a gatis ($P=0,007$), sobretudo quando na presença de *Mhf* ($P=0,000$). Verificou-se conjuntamente com a análise do habitat, que os animais com acesso esporádico à rua ($P=0,031$) e os animais pertencentes a gatis revelavam maior positividade a hemoplasmas, e consecutivamente, maior risco de contrair infecção ($OR=2,18$), como documentado anteriormente (Roura et al., 2010; Willi et al., 2006a). Estes resultados estão de acordo com um estudo realizado em animais utilizados como dadores de sangue, onde se constatou que todos aqueles que viviam em comunidades ou na rua e todos aqueles que tiveram exposição a pulgas obtiveram maiores prevalências de infecção por hemoplasmas (Hackett et al., 2006).

Da avaliação individual das espécies, verificou-se um aumento do número de infecções provocadas por *CMhm* no grupo de animais com proprietário e de interior exclusivo, facto que pode ser explicado pelo acesso esporádico à rua de alguns destes animais e à origem desconhecida de outros, que poderiam ter sido recolhidos de gatis ou mesmo da rua. A presença de *Mhf* foi, maioritariamente detectada nos animais pertencentes a gatis, possivelmente pelo contacto estreito entre animais e o aumento da susceptibilidade para contrair doenças e infecções.

A localização geográfica dos animais foi outro dos factores de risco considerados, tendo-se identificado um aumento da prevalência de infecção nos gatos pertencentes ao distrito de Lisboa e nos animais de Setúbal. Apesar de não ter sido encontrada associação significativa da infecção com a localização geográfica ($P=0,160$), a distribuição dos animais em regiões citadinas revelou maior risco de contrair infecção quando comparada com os animais de zonas

rurais, neste caso do Alentejo (OR=3,85). É, no entanto, necessário cuidado ao comparar ambas as regiões, uma vez que o grupo de animais do Alentejo é consideravelmente menor e os valores encontrados para esta região podem não representar a distribuição real de hemoplasmas aí existente. De acordo com o clima, poder-se-ia pensar que os animais do Alentejo estariam mais susceptíveis a contrair infecções por hemoplasmas, por se verificar nesta região um aumento das temperaturas em relação ao distrito de Lisboa e de Setúbal, facto que tem sido sugerido e documentado por alguns autores (Gentilini et al., 2009; Willi et al., 2006b); no entanto, os baixos índices de precipitação e humidade encontrados nesta região dificultam possivelmente o desenvolvimento e a propagação dos vectores artrópodes e a consequente disseminação destes microorganismos. Quando avaliadas as espécies, verificou-se ainda um aumento da presença de *Mhf* e de *CMt* no distrito de Setúbal, onde foram avaliados animais em gatis, e um aumento de *CMhm* nos animais de Lisboa, grupo que reúne diferentes populações de gatos, incluindo animais de rua, de gatil e aqueles com proprietários. A infecção por hemoplasmas foi detectada em todos os intervalos de idade, e embora não tenha sido identificada qualquer associação significativa ($P=0,932$), verificou-se maior prevalência de infecção no grupo de animais mais jovem, dos 0 aos 6 meses de idade. Observou-se ainda um aumento progressivo da prevalência de infecção nos animais com idades mais avançadas, facto que tem vindo a ser atribuído por alguns autores ao efeito cumulativo da exposição do animal aos agentes transmissores da infecção, ao longo da sua vida (Tasker et al., 2004a). O aumento do número de infecções registado nestes intervalos pode estar associado com a imaturidade do sistema imunitário nos animais mais jovens e com a debilidade do mesmo que ocorre com o avançar da idade, em paralelo com o aparecimento de outras patologias (Bauer et al., 2008; Lobetti & Lappin, 2012; Sykes et al., 2008a; Willi et al., 2006c). Quando avaliadas as espécies individualmente, verificou-se um aumento do número de infecções provocadas por *Mhf* nos animais mais jovens, não surgindo nos animais com idades mais avançadas; ao contrário do *CMhm* e do *CMt*, que neste estudo surgiram tanto nos animais jovens como nos animais mais velhos. Estes dados estão de acordo com a informação documentada na bibliografia revista, uma vez que, os estudos que obtêm associações significativas entre a infecção por hemoplasmas e os animais mais jovens, referem sobretudo a presença de *Mhf*, ao contrário dos estudos que revelam associação significativa da infecção com a idade avançada dos animais, que apontam sobretudo, a presença de *CMhm* (Lobetti & Tasker, 2004; Sykes et al., 2007b; Sykes et al., 2008a; Tasker et al., 2004a).

O género masculino tem sido amplamente associado com a presença de infecção por hemoplasmas (Lobetti & Lappin, 2012; Stojanovic & Foley, 2011; Tasker, 2010; Willi et al.,

2006c), e embora tenha sido encontrada maior prevalência de hemoplasmas em machos ($P=0,05$), a associação significativa foi apenas detectada na infecção provocada pelo *CMt* ($P=0,032$). Quando avaliadas as espécies, verificou-se um aumento do número de infecções provocadas por *CMhm* em ambos os géneros, sendo mais marcado nos machos do que nas fêmeas. Observou-se ainda, que quando presente nos machos, o *Mhf* surgiu maioritariamente em co-infecção ao passo que nas fêmeas, a presença desta espécie surgiu isoladamente. Esta diferença pode relacionar-se possivelmente com o habitat, uma vez que existe um maior número de fêmeas sem acesso à rua. Pode também relacionar-se com o facto deste género não apresentar tanta propensão para participar em lutas como acontece com os animais do sexo masculino. De acordo com este pressuposto, verificou-se que os machos apresentam um risco acrescido para contrair infecção por hemoplasmas, cerca de duas vezes superior ao das fêmeas ($OR=2,11$). Segundo alguns autores, o aumento da prevalência da infecção em machos adultos pode ser atribuído ao estilo de vida livre e ao comportamento de agressividade entre estes animais, resultando num aumento da exposição a gatos infectados por hemoplasmas (Grindem et al., 1990; Harrus et al., 2002; Macieira et al., 2008). No entanto, a detecção destes microorganismos não ocorre necessariamente nos animais com acesso à rua, tendo sido também encontrada em infecções múltiplas de gatos que partilham a mesma casa (de Lorimier & Messick, 2004), como no caso dos animais pertencentes a gatis no presente estudo. Além da transmissão por vectores artrópodes, pode assim pensar-se na possibilidade de ocorrer transmissão destes agentes através de lutas com derramamento de sangue e comportamentos agressivos territoriais, que conduzem ao aumento da susceptibilidade destes animais à infecção, sobretudo naqueles co-infectados por retrovírus.

A relação entre a presença de retrovírus e a infecção por hemoplasmas foi igualmente avaliada no presente estudo, tendo sido apenas detectada associação significativa da infecção por hemoplasmas com a presença de FIV ($P=0,011$). A ausência de associação com a infecção provocada por FeLV pode apenas reflectir o número diminuto de animais infectados por este vírus na população estudada, em relação ao número de animais positivos a FIV. A análise dos factores de risco revela ainda, o risco acrescido em contrair infecções por hemoplasmas nos animais positivos a FIV ($OR=2,58$), contrariamente aos animais infectados por FeLV ($OR=0,75$).

Como seria de esperar, a infecção por retrovírus ocorreu maioritariamente no grupo de animais com acesso à rua e naqueles alojados em gatis, à semelhança da infecção por hemoplasmas. No entanto, a sua presença foi maioritariamente encontrada em fêmeas, ao contrário do que ocorre na infecção por hemoplasmas e dos dados fornecidos anteriormente

por estudos de retrovírus (Little, Sears, Lachtara, & Bienzle, 2009), que identificam o género masculino como um dos factores de risco da infecção.

A presença de FIV foi, no presente estudo, maioritariamente identificada nos animais com idades mais avançadas, comparativamente com aqueles infectados por FeLV, que possuíam idades mais jovens, no entanto, não foi possível determinar o estadio da infecção nem a forma como a presença de retrovírus afectaria os animais positivos a hemoplasmas, uma vez que não foram avaliados os hemogramas, assim como os sinais físicos e clínicos dos gatos testados.

Embora a infecção por hemoplasmas seja amplamente associada com a presença de infecção por retrovírus, alguns estudos referem apenas a associação de determinadas espécies com a presença de FIV e/ou FeLV (George et al., 2002; Harrus et al., 2002; Luria et al., 2004; Macieira et al., 2008; Sykes et al., 2007b). No presente estudo, verificou-se um aumento do número de infecções provocadas por *CMhm* nos animais positivos a FIV, contrariamente aos animais infectados por FeLV que revelaram um aumento de infecções provocadas por *Mhf*. Este factor possivelmente encontrar-se-á associado com a idade dos animais infectados, uma vez que os gatos co-infectados por FIV e *CMhm* apresentam, na sua generalidade, idades mais avançadas, do que os gatos co-infectados por *Mhf* e FeLV, como tem vindo a ser igualmente identificado noutros estudos (Sykes et al., 2008a). Se é a presença de hemoplasmas que aumenta a probabilidade para contrair retrovírus ou se é a quebra de imunidade que estes geram que potencia a infecção por hemoplasmas, no presente estudo nada se pôde concluir, uma vez que era desconhecido o estadio da infecção dos animais em qualquer das situações.

Como seria de esperar, a presença de co-infecção foi maioritariamente detectada nos machos, nos animais pertencentes a gatis, nos animais mais jovens e nos mais velhos, e ainda nos animais co-infectados por retrovírus. A presença simultânea de *Mhf* e *CMhm* tem sido detectada com maior frequência (Martinez-Diaz et al., 2013; Peters et al., 2008a; Tanahara et al., 2010), tal como observado no presente estudo, embora neste tenha sido detectada a co-infecção com as três espécies de hemoplasmas na mesma ordem de valores. A presença de co-infecção com as três espécies de hemoplasmas foi mais evidente nos animais mais jovens e naqueles co-infectados por FeLV, ao passo que a presença simultânea de *Mhf* e *CMhm* foi maioritariamente identificada nos animais infectados por FIV. Nos animais com idades mais avançadas e nos machos foi ainda detectada a presença marcada de *CMhm* e *CMt*. A presença simultânea destas duas espécies tem sido amplamente identificada, sobretudo em animais doentes (Peters et al., 2008a; Willi et al., 2006c), sugerindo que a transmissão de ambas ocorra de forma semelhante. Embora, no presente estudo, não tenha sido realizada a associação de ambas as espécies com a evidência de patologias, a detecção destas espécies em animais com idades mais avançadas pode encontrar-se possivelmente relacionada com a

existência de algumas doenças características da idade nestes animais. A relação entre a presença de co-infecção e o agravamento do estado clínico dos animais não foi possível de determinar no presente estudo, por ausência de conhecimento do estado clínico dos animais admitidos no mesmo.

De uma forma geral, a presença isolada de *Mhf* foi detectada nos animais com menores probabilidades de contrair infecções como, os gatos com proprietário, as fêmeas e os negativos a retrovírus, tendo sido detectado maioritariamente em co-infecção, nos grupos de risco acrescido como, a zona de Lisboa, os machos, os animais mais jovens, os pertencentes a gatis e os positivos a retrovírus. O *CMhm* foi maioritariamente encontrado em infecções isoladas com excepção dos animais co-infectados por retrovírus, contrariamente ao *CMt* que foi quase sempre detectado em associação com outras espécies de hemoplasmas ($P=0,012$), sugerindo ausência de imunidade cruzada e/ou protecção imunitária entre as espécies de hemoplasmas como documentado anteriormente (Peters et al., 2008a; Willi et al., 2006b).

A influência dos factores de risco no desenrolar da infecção não foi ainda completamente esclarecida, atendendo às diferentes condições em que são realizados os estudos. Devem, no entanto, ser considerados todos estes factores, quando se tenta determinar a significância da infecção por hemoplasmas num determinado indivíduo, sobretudo para efeitos de prognóstico e tratamento (Tasker, 2010).

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Tendo em conta a ausência de informação consistente a acompanhar os diferentes conjuntos de amostras, não foram avaliados os sinais clínicos nem as alterações hematológicas de cada animal, a sua origem, a história pregressa e a raça, assim como qualquer informação relativa a vacinações, desparasitações e presença ou ausência de pulgas.

Os resultados obtidos reflectem unicamente o número de animais positivos a hemoplasmas nas diferentes populações analisadas de acordo com as variáveis definidas no estudo, podendo estar sujeitas a viéses que não podemos excluir ou mitigar. Deste modo, não é possível extrapolar tais valores para a população de animais existente nas localidades avaliadas, assim como fazer comparações dos mesmos com outros estudos realizados sob diferentes circunstâncias.

8. CONCLUSÃO

“Em alguma altura da sua vida, até 10% dos gatos saudáveis são infectados por hemoplasmas felinos” (Tasker, 2010, p.375, tradução livre). Este facto, muitas vezes subestimado na prática clínica, pode posteriormente afectar o prognóstico e o tratamento de muitos animais doentes que, sem antecedentes clínicos e exames de diagnóstico, poderiam ter sido portadores assintomáticos da infecção durante anos.

O desconhecimento dos modos de transmissão destes agentes limita, de alguma forma, a implementação de métodos de prevenção e a inadvertida e consequente infecção dos animais e do Homem. Deste modo, o conhecimento dos factores de risco da infecção reveste-se de enorme importância, na medida em que permite a adopção atempada de metodologias de prevenção, sobretudo ao nível da desparasitação e da limitação do contacto entre os animais. Embora a presença de infecção por hemoplasmas felinos nem sempre resulte no aparecimento de doença clínica, o conjunto subsequente de cofactores pode facilmente predispor e conduzir ao agravamento do estado clínico do animal. Assim, é importante fomentar o diagnóstico de retrovírus em gatos provenientes da rua e que contactam com outros animais, assim como a avaliação da presença de hemoplasmas sempre que se justifique, especialmente em gatos anémicos e clinicamente doentes. Torna-se igualmente necessário o despiste destes microorganismos nos animais admitidos como dadores de sangue, de modo a diminuir a disseminação destes agentes infecciosos na população.

Importa lembrar que o estudo da epidemiologia e da cinética da infecção são cada vez mais relevantes num mundo sem barreiras físicas, onde frequentemente ocorre a deslocação de pessoas e animais para diferentes regiões e Países. A expansão de animais domésticos para ambientes silváticos e o seu contacto com hospedeiros reservatórios silvestres e vectores autóctones, assim como as repercussões das alterações climáticas e dos desastres ambientais, têm possibilitado a introdução de vectores e de microorganismos transmissores de doença em zonas não endémicas, aumentando assim a disseminação destes agentes.

A realização deste estudo permitiu a detecção de *Mhf*, *CMhm* e *CMt* numa população distinta de gatos infectados naturalmente em Portugal, complementando a informação epidemiológica já existente a nível nacional. Permitiu igualmente a avaliação da significância de alguns factores de risco implicados no estabelecimento da infecção da população estudada, salientando a importância da adopção de estratégias de prevenção da infecção nos animais.

De acordo com a bibliografia consultada, alguns dos trabalhos de investigação em curso nesta área prendem-se com a tentativa de identificar as diferentes famílias antigénicas possivelmente responsáveis pelos mecanismos de evasão do *Mhf* ao sistema imunitário do

animal infectado (Santos et al.,2011). Segundo Novaco et al. (2012), pesquisas futuras deverão incidir também, no estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na protecção contra a reinfecção pela mesma espécie e, sobretudo, por espécies distintas, como forma de promover o desenvolvimento de vacinas eficazes contra estes tipos de infecções (Novacco et al., 2012b). Ao nível do tratamento, poderão ainda ser realizados trabalhos na área da antibioterapia, nomeadamente no âmbito da resistência aos antibióticos, e no estudo da farmacocinética considerando as diferentes vias de administração (Tasker, 2010). A cultura e propagação destes microorganismos em laboratório tem permanecido inacessível até à data, no entanto, avanços recentes têm sido alcançados através da caracterização do genoma das espécies de hemoplasmas, fornecendo indícios sobre como se perpetua a sobrevivência destes microorganismos no hospedeiro (A. Santos et al., 2011). O seu estudo poderá permitir ainda, o conhecimento dos mecanismos de transmissão destes agentes e, acima de tudo, a investigação do seu potencial zoonótico, já reportado em alguns estudos (Barker & Tasker, 2013).

9. BIBLIOGRAFIA

- Alleman, A. R., Palmer, G. H., McGuire, T. C., McElwain, T. F., Perryman, L. E., & Barbet, A. F. (1997). *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infect Immun*, 65(1), 156-163.
- Alleman, A. R., Pate, M. G., Harvey, J. W., Gaskin, J. M., & Barbet, A. F. (1999). Western Immunoblot Analysis of the Antigens of *Haemobartonella felis* with Sera from Experimentally Infected Cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1474-1479.
- Archer, G. L., Coleman, P. H., Cole, R. M., Duma, R. J., & Johnston, C. L., Jr. (1979). Human infection from an unidentified erythrocyte-associated bacterium. *N Engl J Med*, 301(17), 897-900. doi: 10.1056/nejm197910253011701
- Assarasakorn, S., Veir, J. K., Hawley, J. R., Brewer, M. M., Morris, A. K., Hill, A. E., & Lappin, M. R. (2012). Prevalence of *Bartonella* species, hemoplasmas, and *Rickettsia felis* DNA in blood and fleas of cats in Bangkok, Thailand. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1213-1216. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.015>
- Barker, E. N., Helps, C. R., Heesom, K. J., Arthur, C. J., Peters, I. R., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2010). Detection of Humoral Response Using a Recombinant Heat Shock Protein 70, DnaK, of *Mycoplasma haemofelis* in Experimentally and Naturally Hemoplasma-Infected Cats. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(12), 1926-1932. doi: 10.1128/cvi.00320-10
- Barker, E. N., Helps, C. R., Peters, I. R., Darby, A. C., Radford, A. D., & Tasker, S. (2011a). Complete Genome Sequence of *Mycoplasma haemofelis*, a Hemotropic *Mycoplasma*. *Journal of Bacteriology*, 193(8), 2060-2061. doi: 10.1128/jb.00076-11
- Barker, E. N., Darby, A., Helps, C., Peters, I., Heesom, K., Arthur, C., Crossett, B., Hughes, M., Radford, A., & Tasker, S. (2011b). Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. *Veterinary Research*, 42(1), 83.
- Barker, E. N., Darby, A. C., Helps, C. R., Peters, I. R., Hughes, M. A., Radford, A. D., Novacco, M., Boretti, F. S., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2012). Genome Sequence for “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*,” a Low-Pathogenicity Hemoplasma Species. *Journal of Bacteriology*, 194(4), 905-906. doi: 10.1128/jb.06560-11
- Barker, E. N., & Tasker, S. (2013). Haemoplasmas: lessons learnt from cats. *N Z Vet J*, 61(4), 184-192. doi: 10.1080/00480169.2013.771760
- Barrs, V. R., Beatty, J. A., Wilson, B. J., Evans, N., Gowan, R., Baral, R. M., Lingard, A. E., Perkovic, G., Hawley, J. R., & Lappin, M. R. (2010). Prevalence of *Bartonella* species, *Rickettsia felis*, haemoplasmas and the *Ehrlichia* group in the blood of cats and fleas in eastern Australia. *Aust Vet J*, 88(5), 160-165. doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00569.x
- Bauer, N., Balzer, H. J., Thure, S., & Moritz, A. (2008). Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. *J Feline Med Surg*, 10(3), 252-258. doi: 10.1016/j.jfms.2007.12.004

- Baumann, J., Novacco, M., Riond, B., Boretti, F. S., & Hofmann-Lehmann, R. (2013). Establishment and characterization of a low-dose *Mycoplasma haemofelis* infection model. *Vet Microbiol*. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.033
- Bennett, A. D., Gunn-Moore, D. A., Brewer, M., & Lappin, M. R. (2011). Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasmas and *Toxoplasma gondii* in cats in Scotland. *J Feline Med Surg*, 13(8), 553-557. doi: 10.1016/j.jfms.2011.03.006
- Berent, L. M., Messick, J. B., & Cooper, S. K. (1998). Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *Am J Vet Res*, 59(10), 1215-1220.
- Berent, L. M., Messick, J. B., Cooper, S. K., & Cusick, P. K. (2000). Specific in situ hybridization of *Haemobartonella felis* with a DNA probe and tyramide signal amplification. *Vet Pathol*, 37(1), 47-53.
- Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B., Alleman, A. R., & Pitulle, C. (2002). Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. *Am J Vet Res*, 63(10), 1385-1388.
- Bobade, P. A., Nash, A. S., & Rogerson, P. (1988). Feline haemobartonellosis: clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukaemia virus. *Vet Rec*, 122(2), 32-36.
- Bortoli, C. P. d., André, M. R., Seki, M. C., Pinto, A. A., Machado, S. d. T. Z., & Machado, R. Z. (2012). Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21, 219-223.
- Braddock, J. A., Tasker, S., & Malik, R. (2004). The use of real-time PCR in the diagnosis and monitoring of *Mycoplasma haemofelis* copy number in a naturally infected cat. *J Feline Med Surg*, 6(3), 161-165. doi: 10.1016/j.jfms.2003.12.004
- Braga, M. S. C. O., André, M. R., Freschi, C. R., Teixeira, M. C. A., & Machado, R. Z. (2012). Molecular detection of hemoplasma infection among cats from São Luís island, Maranhão, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 569-575.
- Clark, P., Foster, S. F., & Spencer, P. B. (2002). Detection of *Haemobartonella felis* (*Candidatus Mycoplasma haemofelis*) in Australia that is similar to the 'Ohio' strain. *Aust Vet J*, 80(11), 703-704; discussion 704.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*, 93(4), 307-317. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00044-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00044-0)
- de Lorimier, L.-P., & Messick, J. B. (2004). Anemia Associated With 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in a Feline Leukemia Virus-Negative Cat With Lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(5), 423-427.
- Dean, R. S., Helps, C. R., Gruffydd Jones, T. J., & Tasker, S. (2008). Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. *J Feline Med Surg*, 10(4), 413-417. doi: 10.1016/j.jfms.2007.12.007

- Dowers, K. L., Olver, C., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2002). Use of enrofloxacin for treatment of large-form *Haemobartonella felis* in experimentally infected cats. *J Am Vet Med Assoc*, 221(2), 250-253.
- Dowers, K. L., Tasker, S., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2009). Use of pradofloxacin to treat experimentally induced *Mycoplasma hemofelis* infection in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 70(1), 105-111. doi: 10.2460/ajvr.70.1.105
- Duarte, M. I., Oliveira, M. S., Shikanai-Yasuda, M. A., Mariano, O. N., Takakura, C. F., Pagliari, C., & Corbett, C. E. (1992). *Haemobartonella*-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. *J Infect Dis*, 165(5), 976-977.
- Felder, K. M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Kilchling, T., Schiele, D., Heinritzi, K., Groebel, K., & Hoelzle, L. E. (2011). Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. *Cell Physiol Biochem*, 27(5), 557-564. doi: 10.1159/000329957
- Flint, J. C., & Moss, L. C. (1953). Infectious anemia in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 122(910), 45-48.
- Flint, J. C., Roepke, M. H., & Jensen, R. (1959). Feline infections anemia. II. Experimental cases. *Am J Vet Res*, 20, 33-40.
- Foley, J. E., Harrus, S., Poland, A., Chomel, B., & Pedersen, N. C. (1998). Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am J Vet Res*, 59(12), 1581-1588.
- Foley, J. E., & Pedersen, N. C. (2001). 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', a low-virulence epierthrocytic parasite of cats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 815-817. doi: 10.1099/00207713-51-3-815
- Fujihara, M., Watanabe, M., Yamada, T., Harasawa, R., & ocirc. (2007). Occurrence of '*Candidatus* *Mycoplasma turicensis*' Infection in Domestic Cats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(10), 1061-1063.
- Gary, A. T., Richmond, H. L., Tasker, S., Hackett, T. B., & Lappin, M. R. (2006). Survival of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in blood of cats used for transfusions. *J Feline Med Surg*, 8(5), 321-326. doi: 10.1016/j.jfms.2006.04.005
- Geffen, C. v. (2012). Coinfection with *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in a cat with immune-mediated hemolytic anemia in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 81, 224-228.
- Gentilini, F., Novacco, M., Turba, M. E., Willi, B., Bacci, M. L., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *J Feline Med Surg*, 11(4), 277-285. doi: 10.1016/j.jfms.2008.06.008
- George, J. W., Rideout, B. A., Griffey, S. M., & Pedersen, N. C. (2002). Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *Am J Vet Res*, 63(8), 1172-1178.

- German, A. J., Cannon, M. J., Dye, C., Booth, M. J., Pearson, G. R., Reay, C. A., & Gruffydd-Jones, T. J. (2005). Oesophageal strictures in cats associated with doxycycline therapy. *J Feline Med Surg*, 7(1), 33-41. doi: 10.1016/j.jfms.2004.04.001
- Grindem, C. B., Corbett, W. T., & Tomkins, M. T. (1990). Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 196(1), 96-99.
- Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M. M., Ziegler, U., & Hoelzle, L. E. (2009). *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. *Infection and Immunity*, 77(2), 576-584. doi: 10.1128/iai.00773-08
- Hackett, T. B., Jensen, W. A., Lehman, T. L., Hohenhaus, A. E., Crawford, P. C., Giger, U., & Lappin, M. R. (2006). Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*,' *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia*, and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(5), 700-705. doi: 10.2460/javma.229.5.700
- Harrus, S., Klement, E., Aroch, I., Stein, T., Bark, H., Lavy, E., Mazaki-Tovi, M., & Baneth, G. (2002). Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. *Vet Rec*, 151(3), 82-85.
- Hornok, S., Meli, M. L., Gonczi, E., Ignits, E., Willi, B., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2008). First molecular identification of 'Candidatus *mycoplasma haemominutum*' from a cat with fatal haemolytic anaemia in Hungary. *Acta Vet Hung*, 56(4), 441-450. doi: 10.1556/AVet.56.2008.4.2
- Hu, Z., Yin, J., Shen, K., Kang, W., & Chen, Q. (2009). Outbreaks of hemotropic mycoplasma infections in China. *Emerg Infect Dis*, 15(7), 1139-1140. doi: 10.3201/eid1507.090174
- Ishak, A. M., Radecki, S., & Lappin, M. R. (2007). Prevalence of *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', *Bartonella* species, *Ehrlichia* species, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the blood of cats with anemia. *J Feline Med Surg*, 9(1), 1-7. doi: 10.1016/j.jfms.2006.05.003
- Ishak, A. M., Dowers, K. L., Cavanaugh, M. T., Powell, C. C., Hawley, J. R., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2008). Marbofloxacin for the treatment of experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. *J Vet Intern Med*, 22(2), 288-292. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0052.x
- Jain, N. C., & Keeton, K. S. (1973). Scanning electron microscopic features of *Haemobartonella felis*. *Am J Vet Res*, 34(5), 697-700.
- Jensen, W. A., Lappin, M. R., Kamkar, S., & Reagan, W. J. (2001). Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am J Vet Res*, 62(4), 604-608.
- Juvet, F., Lappin, M. R., Brennan, S., & Mooney, C. T. (2010). Prevalence of selected infectious agents in cats in Ireland. *J Feline Med Surg*, 12(6), 476-482. doi: 10.1016/j.jfms.2010.02.003
- Kallick, C. A., Levin, S., Reddi, K. T., & Landau, W. L. (1972). Systemic lupus erythematosus associated with haemobartonella-like organisms. *Nat New Biol*, 236(66), 145-146.

- Kamrani, A., Parreira, V. R., Greenwood, J., & Prescott, J. F. (2008). The prevalence of Bartonella, hemoplasma, and Rickettsia felis infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *Can J Vet Res*, 72(5), 411-419.
- Kewish, K. E., Appleyard, G. D., Myers, S. L., Kidney, B. A., & Jackson, M. L. (2004). Mycoplasma haemofelis and Mycoplasma haemominutum detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. *Can Vet J*, 45(9), 749-752.
- Korman, R. M., Cerón, J. J., Knowles, T. G., Barker, E. N., Eckersall, P. D., & Tasker, S. (2012). Acute phase response to Mycoplasma haemofelis and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infection in FIV-infected and non-FIV-infected cats. *The Veterinary Journal*, 193(2), 433-438. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.12.009>
- Krengel, A., Meli, M. L., Cattori, V., Wachter, B., Willi, B., Thalwitzer, S., Melzheimer, J., Hofer, H., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2013). First evidence of hemoplasma infection in free-ranging Namibian cheetahs (Acinonyx jubatus). *Vet Microbiol*, 162(2-4), 972-976. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.009
- Laberke, S., Just, F., Pfister, K., & Hartmann, K. (2010). Prevalence of feline haemoplasma infection in cats in Southern Bavaria, Germany, and infection risk factor analysis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 123(1-2), 42-48.
- Lappin, M. R., Brewer, M., & Radecki, S. (2002). Effects of imidocarb dipropionate in cats with chronic haemobartonellosis. *Vet Ther*, 3(2), 144-149.
- Lappin, M. R., Griffin, B., Brunt, J., Riley, A., Burney, D., Hawley, J., Brewer, M. M., & Jensen, W. A. (2006). Prevalence of Bartonella species, haemoplasma species, Ehrlichia species, Anaplasma phagocytophilum, and Neorickettsia risticii DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J Feline Med Surg*, 8(2), 85-90. doi: 10.1016/j.jfms.2005.08.003
- Little, S., Sears, W., Lachtara, J., & Bienzle, D. (2009). Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. *Can Vet J*, 50(6), 644-648.
- Lobetti, R. G., & Tasker, S. (2004). Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. *J S Afr Vet Assoc*, 75(2), 94-99.
- Lobetti, R. G., & Lappin, M. R. (2012). Prevalence of Toxoplasma gondii, Bartonella species and haemoplasma infection in cats in South Africa. *J Feline Med Surg*, 14(12), 857-862. doi: 10.1177/1098612x12452495
- Love, J. N., Wilson, R. P., McEwen, E. G., & Wiygul, G. (1977). Metabolism of [14C]glucose in Haemobartonella-like infected erythrocytes in splenectomized calves. *Am J Vet Res*, 38(6), 739-741.
- Luria, B. J., Levy, J. K., Lappin, M. R., Breitschwerdt, E. B., Legendre, A. M., Hernandez, J. A., Gorman, S. P., & Lee, I. T. (2004). Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *J Feline Med Surg*, 6(5), 287-296. doi: 10.1016/j.jfms.2003.11.005
- Macieira, D. B., de Menezes Rde, C., Damico, C. B., Almosny, N. R., McLane, H. L., Daggy, J. K., & Messick, J. B. (2008). Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline

- leukemia virus in Rio de Janeiro--Brazil. *J Feline Med Surg*, 10(2), 120-129. doi: 10.1016/j.jfms.2007.08.002
- Maher, I. E., Tasker, S., Polizopoulou, Z., Dasopoulou, A., Egan, K., Helps, C. R., & Papasoulitis, K. (2010). Polymerase chain reaction survey of feline haemoplasma infections in Greece. *J Feline Med Surg*, 12(8), 601-605. doi: 10.1016/j.jfms.2010.02.004
- Martinez-Diaz, V. L., Silvestre-Ferreira, A. C., Vilhena, H., Pastor, J., Francino, O., & Altet, L. (2013). Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *J Feline Med Surg*. doi: 10.1177/1098612x13480985
- McGrotty, Y. L., & Knottenbelt, C. M. (2002). Oesophageal stricture in a cat due to oral administration of tetracyclines. *J Small Anim Pract*, 43(5), 221-223.
- McLaughlin, B. G., Evans, C. N., McLaughlin, P. S., Johnson, L. W., Smith, A. R., & Zachary, J. F. (1990). An Eperythrozoon-like parasite in llamas. *J Am Vet Med Assoc*, 197(9), 1170-1175.
- Messick, J. B., Berent, L. M., & Cooper, S. K. (1998). Development and Evaluation of a PCR-Based Assay for Detection of *Haemobartonella felis* in Cats and Differentiation of *H. felis* from Related Bacteria by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 462-466.
- Messick, J. B., & Harvey, J. W. (2011). Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) *Greene - Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4th ed., pp. 310-319): Elsevier/Saunders.
- Messick, J. B., & Santos, A. P. (2011). Identification, Bioinformatics Analyses, and Expression of Immunoreactive Antigens of *Mycoplasma haemofelis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(8), 1275-1281. doi: 10.1128/cvi.05060-11
- Museux, K., Boretti, F., S., Willi, B., Riond, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L., E., Wittenbrink, M., Tasker, S., Wengi, N., Reusch, C., E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). In vivo transmission studies of 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' in the domestic cat. *Vet. Res.*, 40(5), 45.
- Nash, A. S., & Bobade, P. A. (1986). *Haemobartonella felis* infection in cats from the Glasgow area. *Vet Rec*, 119(15), 373-375.
- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 891-899. doi: 10.1099/00207713-51-3-891
- Neimark, H., Johansson, K.-E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2002). Revision of haemotropic *Mycoplasma* species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 683.
- Novacco, M., Boretti, F., Wolf-Jackel, G., Riond, B., Meli, M., Willi, B., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2011). Chronic "Candidatus *Mycoplasma turicensis*" infection. *Veterinary Research*, 42(1), 59.

- Novacco, M., Wolf-Jäckel, G., Riond, B., & Hofmann-Lehmann, R. (2012a). Humoral immune response to a recombinant hemoplasma antigen in experimental 'Candidatus Mycoplasma turicensis' infection. *Veterinary Microbiology*, 157(3–4), 464-470. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.036>
- Novacco, M., Boretto, F., Franchini, M., Riond, B., Meli, M., & Hofmann-Lehmann, R. (2012b). Protection from reinfection in "Candidatus Mycoplasma turicensis"-infected cats and characterization of the immune response. *Veterinary Research*, 43(1), 82.
- Novacco, M., Riond, B., Meli, M. L., Grest, P., & Hofmann-Lehmann, R. (2013). Tissue sequestration of 'Candidatus Mycoplasma turicensis'. *Vet Microbiol.* doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.019
- Peters, I. R., Helps, C. R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2008a). The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Veterinary Microbiology*, 126(1–3), 142-150. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.017>
- Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J., Hoelzle, L. E., Willi, B., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2008b). RNase P RNA Gene (rnpB) Phylogeny of Hemoplasmas and Other Mycoplasma Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1873-1877. doi: 10.1128/jcm.01859-07
- Peters, I. R., Helps, C. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J., & Tasker, S. (2010). Antigen specificity of the humoral immune response to Mycoplasma haemofelis infection. *Clin Vaccine Immunol*, 17(8), 1238-1243. doi: 10.1128/cvi.00136-10
- Peters, I. R., Helps, C. R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J., & Tasker, S. (2011). Detection of feline haemoplasma species in experimental infections by in-situ hybridisation. *Microb Pathog*, 50(2), 94-99. doi: 10.1016/j.micpath.2010.09.003
- Puntaric, V., Bor?i, D., Vukelic, D., Jeren, T., Burek, V., Wikerhauser, T., & Richter, B. (1986). EPERYTHROZONOSIS IN MAN. *The Lancet*, 328(8511), 868-869.
- Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1094-1156.
- Reubel, G. H., Dean, G. A., George, J. W., Barlough, J. E., & Pedersen, N. C. (1994). Effects of incidental infections and immune activation on disease progression in experimentally feline immunodeficiency virus-infected cats. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 7(10), 1003-1015.
- Reynolds, C. A., & Lappin, M. R. (2007). "Candidatus Mycoplasma haemominutum" Infections in 21 Client-Owned Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43(5), 249-257.
- Rikihisa, Y., Kawahara, M., Wen, B., Kociba, G., Fuerst, P., Kawamori, F., Suto, C., Shibata, S., & Futohashi, M. (1997). Western immunoblot analysis of Haemobartonella muris and comparison of 16S rRNA gene sequences of H. muris, H. felis, and Eperythrozoon suis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 823-829.
- Roura, X., Peters, I. R., Altet, L., Tabar, M.-D., Barker, E. N., Planellas, M., Helps, C. R., Francino, O., Shaw, S. E., & Tasker, S. (2010). Prevalence of Hemotropic

Mycoplasmas in Healthy and Unhealthy Cats and Dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(2), 270-274. doi: 10.1177/104063871002200219

- Santos, A. P., Santos, R. P., Biondo, A. W., Dora, J. M., Goldani, L. Z., Oliveira, S. T., Guimaraes, A. M., Timenetsky, J., Morais, H. A., Gonzalez, F. H., & Messick, J. B. (2008). Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14(12), 1922-1924. doi: 10.3201/eid1412.080964
- Santos, A. P., Messick, J. B., Biondo, A. W., Oliveira, S. T., Pedralli, V., Lasta, C. S., Lacerda, L. A., Esteves, V. S., Hofmann-Lehmann, R., Willi, B., & Gonzalez, F. H. (2009). Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' 16S rDNA in domestic cats from Brazil. *Vet Clin Pathol*, 38(4), 443-452. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00158.x
- Santos, A. P., Guimaraes, A., do Nascimento, N., SanMiguel, P., Martin, S., & Messick, J. (2011). Genome of Mycoplasma haemofelis, unraveling its strategies for survival and persistence. *Veterinary Research*, 42(1), 102.
- Schabereiter-Gurtner, C., Lubitz, W., & Rolleke, S. (2003). Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J Microbiol Methods*, 52(2), 251-260.
- Schreiner, S. A., Hoelzle, K., Hofmann-Lehmann, R., Hamburger, A., Wittenbrink, M. M., Kramer, M. M., Sokoli, A., Felder, K. M., Groebel, K., & Hoelzle, L. E. (2012). Nanotransformation of the haemotrophic Mycoplasma suis during in vitro cultivation attempts using modified cell free Mycoplasma media. *Veterinary Microbiology*, 160(1-2), 227-232. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.022
- Shaw, S. E., Kenny, M. J., Tasker, S., & Birtles, R. J. (2004). Pathogen carriage by the cat flea Ctenocephalides felis (Bouché) in the United Kingdom. *Veterinary Microbiology*, 102(3-4), 183-188. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.06.013
- Steer, J. A., Tasker, S., Barker, E. N., Jensen, J., Mitchell, J., Stocki, T., Chalker, V. J., & Hamon, M. (2011). A novel hemotropic Mycoplasma (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. *Clin Infect Dis*, 53(11), e147-151. doi: 10.1093/cid/cir666
- Stojanovic, V., & Foley, P. (2011). Infectious disease prevalence in a feral cat population on Prince Edward Island, Canada. *Can Vet J*, 52(9), 979-982.
- Sykes, J. E., Ball, L. M., Bailiff, N. L., & Fry, M. M. (2005). 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 27-30. doi: 10.1099/ijs.0.02989-0
- Sykes, J. E., Henn, J. B., Kasten, R. W., Allen, C., & Chomel, B. B. (2007a). Bartonella henselae infection in splenectomized domestic cats previously infected with hemotropic Mycoplasma species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116(1-2), 104-108. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.12.004
- Sykes, J. E., Drazenovich, N. L., Ball, L. M., & Leutenegger, C. M. (2007b). Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology

- of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *J Vet Intern Med*, 21(4), 685-693.
- Sykes, J. E., Terry, J. C., Lindsay, L. L., & Owens, S. D. (2008a). Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(3), 372-379. doi: 10.2460/javma.232.3.372
- Sykes, J. E., Owens, S. D., Terry, J. C., Lindsay, L. L., & Pusterla, N. (2008b). Use of Dried Blood Smears for Detection of Feline Hemoplasmas Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(5), 616-620. doi: 10.1177/104063870802000513
- Sykes, J. E. (2010a). Feline hemotropic mycoplasmas. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 20(1), 62-69. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00491.x
- Sykes, J. E. (2010b). Feline hemotropic mycoplasmas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40(6), 1157-1170. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.07.003
- Sykes, J. E., Lindsay, L. L., Maggi, R. G., & Breitschwerdt, E. B. (2010). Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. *J Clin Microbiol*, 48(10), 3782-3785. doi: 10.1128/jcm.01029-10
- Tanahara, M., Miyamoto, S., Nishio, T., Yoshii, Y., Sakuma, M., Sakata, Y., Nishigaki, K., Tsujimoto, H., Setoguchi, A., & Endo, Y. (2010). An epidemiological survey of feline hemoplasma infection in Japan. *J Vet Med Sci*, 72(12), 1575-1581.
- Taroura, S., Shimada, Y., Sakata, Y., Miyama, T., Hiraoka, H., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M., & Inokuma, H. (2005). Detection of DNA of '*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*' and '*Spiroplasma* sp. in Unfed Ticks Collected from Vegetation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(12), 1277-1279.
- Tasker, S., Helps, C. R., Belford, C. J., Birtles, R. J., Day, M. J., Sparkes, A. H., Gruffydd-Jones, T. J., & Harbour, D. A. (2001). 16S rDNA comparison demonstrates near identity between an United Kingdom *Haemobartonella felis* strain and the American California strain. *Veterinary Microbiology*, 81(1), 73-78. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00331-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00331-5)
- Tasker, S., & Lappin, M. R. (2002). *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *J Feline Med Surg*, 4(1), 3-11. doi: 10.1053/jfms.2001.0155
- Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Harbour, D. A., Shaw, S. E., Harrus, S., Baneth, G., Lobetti, R. G., Malik, R., Beaufils, J. P., Belford, C. R., & Gruffydd-Jones, T. J. (2003a). Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: an International Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3877-3880. doi: 10.1128/jcm.41.8.3877-3880.2003
- Tasker, S., Binns, S. H., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., Harbour, D. A., Helps, C. R., Jensen, W. A., Olver, C. S., & Lappin, M. R. (2003b). Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. *Vet Rec*, 152(7), 193-198.
- Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., & Harbour, D. A. (2003c). Use of Real-Time PCR To Detect and Quantify *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus*

- Mycoplasma haemominutum" DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 439-441. doi: 10.1128/jcm.41.1.439-441.2003
- Tasker, S., Braddock, J. A., Baral, R., Helps, C. R., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., & Malik, R. (2004a). Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. *J Feline Med Surg*, 6(6), 345-354. doi: 10.1016/j.jfms.2003.12.003
- Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Harbour, D. A., Gruffydd-Jones, T. J., & Lappin, M. R. (2004b). Use of a Taqman PCR to determine the response of Mycoplasma haemofelis infection to antibiotic treatment. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 63-71. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.017>
- Tasker, S., Caney, S. M., Day, M. J., Dean, R. S., Helps, C. R., Knowles, T. G., Lait, P. J., Pinches, M. D., & Gruffydd-Jones, T. J. (2006a). Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infection. *Microbes Infect*, 8(3), 653-661. doi: 10.1016/j.micinf.2005.08.015
- Tasker, S., Caney, S. M. A., Day, M. J., Dean, R. S., Helps, C. R., Knowles, T. G., Lait, P. J. P., Pinches, M. D. G., & Gruffydd-Jones, T. J. (2006b). Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on Mycoplasma haemofelis infection. *Veterinary Microbiology*, 117(2-4), 169-179. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.06.015>
- Tasker, S., Peters, I. R., Papasouliotis, K., Cue, S. M., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T. J., Knowles, T. G., Day, M. J., & Helps, C. R. (2009a). Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: Copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations. *Veterinary Microbiology*, 139(3-4), 323-332. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.028>
- Tasker, S., Peters, I. R., Day, M. J., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T. J., & Helps, C. R. (2009b). Distribution of Mycoplasma haemofelis in blood and tissues following experimental infection. *Microb Pathog*, 47(6), 334-340. doi: 10.1016/j.micpath.2009.09.009
- Tasker, S. (2010). Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? *J Feline Med Surg*, 12(5), 369-381. doi: 10.1016/j.jfms.2010.03.011
- Tasker, S., Peters, I. R., Mumford, A. D., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., Day, S., Pretorius, A. M., Birtles, R. J., Helps, C. R., & Neimark, H. (2010). Investigation of human haemotropic Mycoplasma infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. *J Med Microbiol*, 59(Pt 11), 1285-1292. doi: 10.1099/jmm.0.021691-0
- Uilenberg, G., Thiaucourt, F., & Jongejan, F. (2004). On molecular taxonomy: what is in a name? *Exp Appl Acarol*, 32(4), 301-312.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5), 619-626. doi: 10.2144/000112776
- VanSteenhouse, J. L., Taboada, J., & Dorfman, M. I. (1995). Hemobartonella felis infection with atypical hematological abnormalities. *J Am Anim Hosp Assoc*, 31(2), 165-169.

- Vogt, A. H., Rodan, I., Brown, M., Brown, S., Buffington, C. A., Forman, M. J., Neilson, J., & Sparkes, A. (2010). AAFP-AAHA: Feline life stage guidelines. *J Am Anim Hosp Assoc*, 46(1), 70-85.
- Wardrop, K. J., Reine, N., Birkenheuer, A., Hale, A., Hohenhaus, A., Crawford, C., & Lappin, M. R. (2005). Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J Vet Intern Med*, 19(1), 135-142.
- Westfall, D. S., Jensen, W. A., Reagan, W. J., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2001). Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. *Am J Vet Res*, 62(5), 687-691.
- Willi, B., Boretti, F. S., Cattori, V., Tasker, S., Meli, M. L., Reusch, C., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2005). Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2581-2585. doi: 10.1128/jcm.43.6.2581-2585.2005
- Willi, B., Boretti, F. S., Baumgartner, C., Cattori, V., Meli, M. L., Doherr, M. G., Reusch, C. E., & Hofmann-Lehmann, R. (2006a). [Feline hemoplasmas in Switzerland: identification of a novel species, diagnosis, prevalence, and clinical importance]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 148(3), 139-140, 142, 144 passim.
- Willi, B., Tasker, S., Boretti, F. S., Doherr, M. G., Cattori, V., Meli, M. L., Lobetti, R. G., Malik, R., Reusch, C. E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2006b). Phylogenetic Analysis of "Candidatus *Mycoplasma turicensis*" Isolates from Pet Cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with Analysis of Risk Factors for Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4430-4435. doi: 10.1128/jcm.00987-06
- Willi, B., Boretti, F. S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M. L., Reusch, C. E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2006c). Prevalence, Risk Factor Analysis, and Follow-Up of Infections Caused by Three Feline Hemoplasma Species in Cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 961-969. doi: 10.1128/jcm.44.3.961-969.2006
- Willi, B., Boretti, F. S., Meli, M. L., Bernasconi, M. V., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C. E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2007a). Real-Time PCR Investigation of Potential Vectors, Reservoirs, and Shedding Patterns of Feline Hemotropic Mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3798-3802. doi: 10.1128/aem.02977-06
- Willi, B., Filoni, C., Catao-Dias, J. L., Cattori, V., Meli, M. L., Vargas, A., Martinez, F., Roelke, M. E., Ryser-Degiorgis, M. P., Leutenegger, C. M., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2007b). Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *J Clin Microbiol*, 45(4), 1159-1166. doi: 10.1128/jcm.02005-06
- Willi, B., Meli, M. L., Lüthy, R., Honegger, H., Wengi, N., Hoelzle, L. E., Reusch, C. E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Development and Application of a Universal Hemoplasma Screening Assay Based on the SYBR Green PCR Principle. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 4049-4054. doi: 10.1128/jcm.01478-09
- Willi, B., Museux, K., Novacco, M., Schraner, E. M., Wild, P., Groebel, K., Ziegler, U., Wolf-Jäckel, G. A., Kessler, Y., Geret, C., Tasker, S., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2011). First morphological characterization of 'Candidatus *Mycoplasma*

- turicensis' using electron microscopy. *Veterinary Microbiology*, 149(3–4), 367-373. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.020>
- Wolf-Jäckel, G. A., Jäckel, C., Museux, K., Hoelzle, K., Tasker, S., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2010). Identification, Characterization, and Application of a Recombinant Antigen for the Serological Investigation of Feline Hemotropic Mycoplasma Infections. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(12), 1917-1925. doi: 10.1128/cvi.00282-10
- Wolf-Jäckel, G. A., Cattori, V., Geret, C. P., Novacco, M., Meli, M. L., Riond, B., Boretti, F. S., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2012). Quantification of the humoral immune response and hemoplasma blood and tissue loads in cats coinfecting with 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and feline leukemia virus. *Microbial Pathogenesis*, 53(2), 74-80. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2012.05.003>
- Woods, J. E., Brewer, M. M., Hawley, J. R., Wisniewski, N., & Lappin, M. R. (2005). Evaluation of experimental transmission of Candidatus Mycoplasma haemominutum and Mycoplasma haemofelis by Ctenocephalides felis to cats. *Am J Vet Res*, 66(6), 1008-1012.
- Yu, D. H., Kim, H. W., Desai, A. R., Han, I. A., Li, Y. H., Lee, M. J., Kim, I. S., Chae, J. S., & Park, J. (2007). Molecular detection of feline hemoplasmas in feral cats in Korea. *J Vet Med Sci*, 69(12), 1299-1301.
- Yuan, C. L., Liang, A., Yu, F., Yang, Z., Li, Z., Zhu, J., Cui, L., Han, Y., & Hua, X. (2007). Eperythrozoon infection identified in an unknown aetiology anaemia patient. *Annals of Microbiology*, 57(3), 467-469. doi: 10.1007/BF03175091
- Yuan, C. L., Liang, A. B., Yao, C. B., Yang, Z. B., Zhu, J. G., Cui, L., Yu, F., Zhu, N. Y., Yang, X. W., & Hua, X. G. (2009). Prevalence of Mycoplasma suis (Eperythrozoon suis) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *Am J Vet Res*, 70(7), 890-894. doi: 10.2460/ajvr.70.7.890
- Zachary, J. F., & Smith, A. R. (1985). Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. *Am J Vet Res*, 46(4), 821-830.
- Zulty, J. C., & Kociba, G. J. (1990). Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. *J Am Vet Med Assoc*, 196(6), 907-910.

10. ANEXOS

10.1 Actividades desenvolvidas – Comunicação científica dos resultados obtidos no presente estudo no Congresso Internacional da Scivac.

Figura 24 – Cópia das páginas do livro de resumos onde consta a comunicação realizada.



Figura 24 (Continuação) - Cópia das páginas do livro de resumos onde consta a comunicação realizada.



10.2 Resultados

10.2.1 Tabela utilizada como base de dados para os cálculos do estudo

Tabela 7 – Tabela utilizada como base de dados do estudo.

Nº positivos/ Variáveis	Mhf	CMhm	CMt	T	Mhf/ CMhm	Mhf/ CMt	CMhm/ CMt	Mhf/CMt/ CMhm	T	Qualquer Mhf	Qualquer CMhm	Qualquer CMt	T
Agrupados (n=236)													
Vida livre (Alentejo) (n=21)	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Pertencentes a gatis (n=139)	16	14	1	31	6	2	2	7	17	31	29	12	72
Animais com dono (n=76)	2	9	1	12	1	0	1	0	2	3	11	2	16
Total	18	25	2	45	7	2	3	7	19	34	42	14	90
Grupo (n=236)													
Gatil CML (n=42)	7	3	0	10	6	0	0	2	8	15	11	2	28
Alentejo (n=21)	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2
CATUS (n=24)	2	3	0	5	0	1	1	3	5	6	7	5	18
HEV-FMV (n=50)	2	6	1	9	1	0	1	0	2	3	8	2	13
Gatil Moita (n=50)	7	3	1	11	0	1	1	1	3	9	5	4	18
BSV-FMV (n=49)	0	8	0	8	0	0	0	1	1	1	9	1	11
Total	18	25	2	45	7	2	3	7	19	34	42	14	90
Localidade (n=236)													
Lisboa (n= 165)	11	20	1	32	7	1	2	6	16	25	35	10	70
Setúbal (n=50)	7	3	1	11	0	1	1	1	3	9	5	4	18
Alentejo (n=21)	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Total	18	25	2	45	7	2	3	7	19	34	42	14	90
Género (n=168)													
Macho (n=85)	4	12	2	18	1	2	3	3	9	10	19	10	39
Fêmea (n=83)	6	7	0	13	0	0	0	2	2	8	9	2	19
Total	10	19	2	31	1	2	3	5	11	18	28	12	58

Tabela 7 (Continuação) – Tabela utilizada como base de dados do estudo.

Nº positivos/ Variáveis	Mhf	CMhm	CMt	T	Mhf/ CMhm	Mhf/ CMt	CMhm/ CMt	Mhf/CMt/ CMhm	T	Qualquer Mhf	Qualquer CMhm	Qualquer CMt	T
Idade (n=150)													
0-6 Meses (n=5)	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	2	1	4
7 Meses-2 Anos (n=31)	2	2	1	5	0	0	0	2	2	4	4	3	11
3-6 Anos (n=63)	3	6	0	9	0	2	2	2	6	7	10	6	23
7-10 Anos (n=37)	1	7	0	8	1	0	0	0	1	2	8	0	10
11-14 Anos (n=8)	1	1	0	2	0	0	0	0	0	1	1	0	2
15-25 Anos (n=6)	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	2	1	3
Total	7	18	1	26	1	2	3	5	11	15	27	11	53
Habitat (n=212)													
Gatil (n=139)	16	14	1	31	6	2	2	7	17	31	29	12	72
Casa (n=41)	2	4	0	6	1	0	0	0	1	3	5	0	8
Casa com acesso ao exterior (n=11)	0	2	1	3	0	0	0	0	0	0	2	1	3
Rua (n=21)	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Total	18	22	2	42	7	2	2	7	18	34	38	13	85
Teste FIV (n=206)													
Negativo (n=166)	13	17	2	32	3	0	1	4	8	20	25	7	52
Positivo (n=40)	4	6	0	10	4	1	1	2	8	11	13	4	28
Total	17	23	2	42	7	1	2	6	16	31	38	11	80
Teste FeLV (n=203)													
Negativo (n=186)	16	23	2	41	6	1	2	4	13	27	35	9	71
Positivo (n=17)	1	0	0	1	1	0	0	2	3	4	3	2	9
Total	17	23	2	42	7	1	2	6	16	31	38	11	80

10.2.2 Análise da prevalência geral de hemoplasmas

Tabela 8 - Prevalência geral de hemoplasmas de acordo com as variáveis em estudo.

	% hemoplasmas	% <i>Mhf</i>	% <i>CMhm</i>	% <i>CMt</i>	% <i>CoI</i>
Estilo de vida (n=236)					
Animais com proprietário (n=76)	18,4% (14/76)	3,9% (3/76)	14,5% + (11/76)	2,6% (2/76)	2,6% (2/76)
Animais de vida livre (n=21)	9,5% (2/21)		9,5% (2/21)		
Animais pertencentes a gatis (n=139)	34,5% + (48/139)	22,3% + (31/139)	20,9% (29/139)	8,6% (12/139)	12,2% + (17/139)
Localidade (n=236)					
Lisboa (n=165)	29,1% + (48/165)	15,2% (25/165)	21,2% + (35/165)	6,1% (10/165)	9,7% + (16/165)
Setúbal (n=50)	28% + (14/50)	18% + (9/50)	10% (5/50)	8% (4/50)	6% (3/50)
Alentejo (n=21)	9,5% (2/21)		9,5 % (2/21)		
Género (n=168)					
Machos (n=85)	31,8% + (27/85)	11,8% (10/85)	22,4% + (19/85)	11,8% (10/85)	10,6% + (9/85)
Fêmeas (n=83)	18,1% (15/83)	9,6% (8/83)	10,8% + (9/83)	2,4% (2/83)	2,4% (2/83)
Idade (n=150)					
0 – 6 Meses (n=5)	40% + (2/5)	20% (1/5)	40% + (2/5)	20% (1/5)	20% + (1/5)
7 Meses – 2 Anos (n=31)	22,6% (7/31)	12,9% + (4/31)	12,9% + (4/31)	9,7% (3/31)	6,5% (2/31)
3 - 6 Anos (n=63)	23,8% (15/63)	11,1% (7/63)	15,9% + (10/63)	9,5% (6/63)	9,5% (6/63)
7 – 10 Anos (n=37)	24,3% (9/37)	5,4% (2/37)	22% + (8/37)		2,7% (1/37)

Tabela 8 (Continuação) - Prevalência geral de hemoplasmas de acordo com as variáveis em estudo.

	% hemoplasmas	% <i>Mhf</i>	% <i>CMhm</i>	% <i>CMt</i>	% <i>CoI</i>
--	---------------	--------------	---------------	--------------	--------------

11 – 14 Anos (n=8)	25% (2/8)	12,5% + (1/8)	12,5% + (1/8)		
15 – 25 Anos (n=6)	33,3% + (2/6)		33,3% + (2/6)	16,7% (1/6)	16,7% + (1/6)
Habitat (n=212)					
Gatil (n=139)	34,5% + (48/139)	22,3% + (31/139)	20,9% + (29/139)	8,6% (12/139)	12,2% + (17/139)
Interior exclusivo (n=41)	17,1% (7/41)	7,3% (3/41)	12,2% + (5/41)		2,4% (1/41)
Acesso esporádico à rua (n=11)	27,3% + (3/11)		18,2% + (2/11)	9,1% (1/11)	
Vida livre (n=21)	9,5% (2/21)		9,5% (2/21)		
Teste de FIV (n=206)					
Positivo (n=40)	45% + (18/40)	27,5% (11/40)	32,5% + (13/40)	10% (4/40)	20% + (8/40)
Negativo (n=166)	24,1% (40/166)	12,0% (20/166)	15,1% + (25/166)	4,2% (7/166)	4,8% (8/166)
Teste de FeLV (n=203)					
Positivo (n=17)	23,5% (4/17)	23,5% + (4/17)	17,6% (3/17)	11,8% (2/17)	17,7% + (3/17)
Negativo (n=186)	29,0% + (54/186)	14,5% (27/186)	18,8% + (35/186)	4,8% (9/186)	6,9% (13/186)

Legenda da tabela: + - Aumento do número de infecções

10.2.3 Compilação de gráficos não utilizados no corpo do texto referentes à prevalência e tipos de co-infecção.

Gráfico 21 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção.

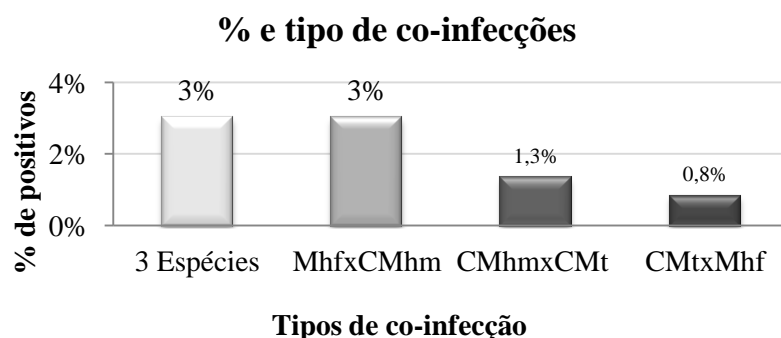


Gráfico 22 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção de acordo com o estilo de vida dos animais.

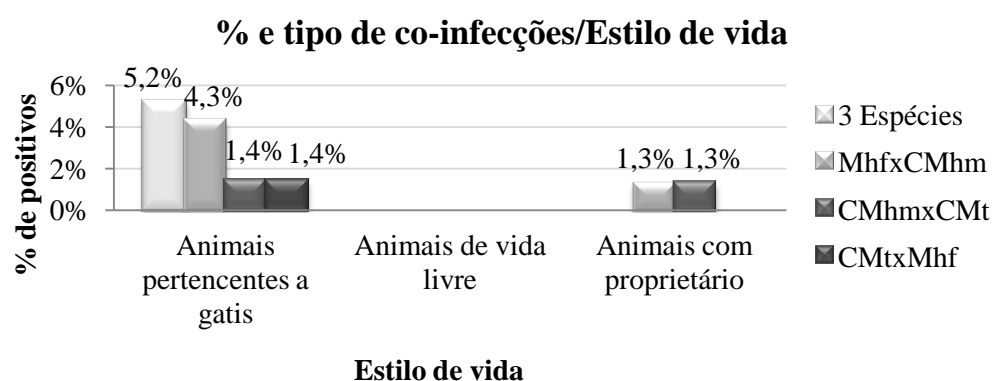


Gráfico 23 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção de acordo com a localização geográfica.

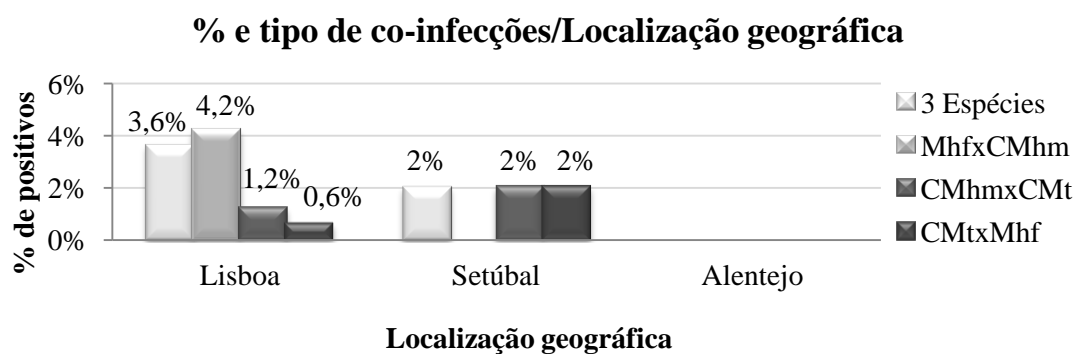


Gráfico 24 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção de acordo com o género.

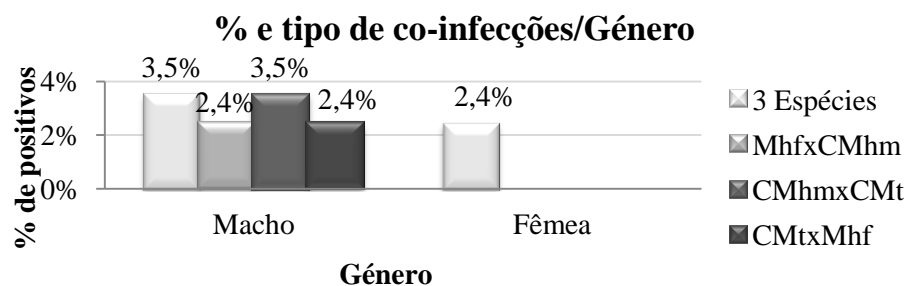


Gráfico 25 - Observação da percentagem e tipo de co-infecção de acordo com o intervalo de idades.

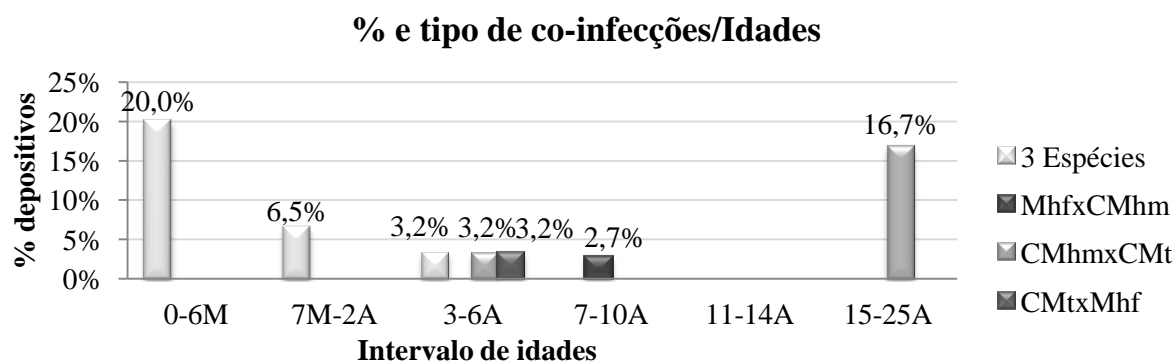


Gráfico 26 - Observação da percentagem e tipo de co-infecção de acordo com o habitat.

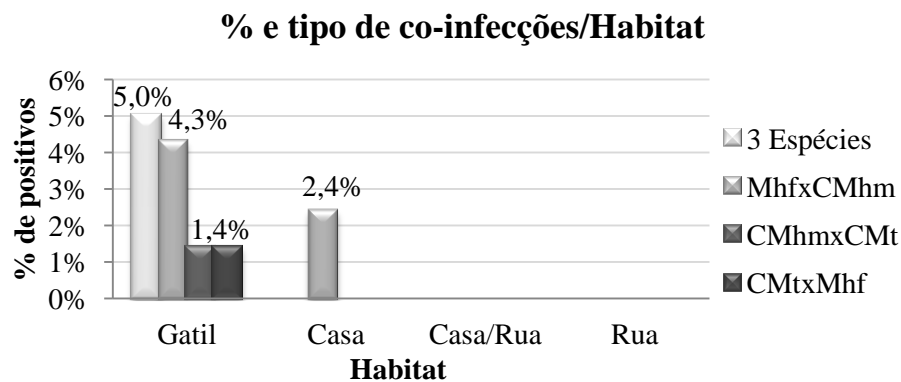


Gráfico 27 - Observação da percentagem e do tipo de co-infecção de acordo com o resultado do teste para pesquisa de retrovírus.

